

**Versuche zur Entwicklung
eines intrahepatischen
Cholestasemodells beim Hund
mit Lithocholsäure**

Angelika Freitag

1982

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. D. Hegner

VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES INTRAHEPATISCHEN
CHOLESTASEMODELLS BEIM HUND MIT LITHOCHOLSÄURE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Angelika Freitag
aus Detmold

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. G. Terplan
Referent:	Prof. Dr. D. Hegner
Korreferent:	Priv. Doz. Dr. Dr.habil. J. Wittmar

Tag der Promotion: 26. Februar 1982



Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. D. HEGNER

in Gedenken und Dankbarkeit gewidmet.

Detmold, Mai 1982

Inhaltsverzeichnis

1.1.	Einleitung	1
1.2.	Problemstellung	2
2.	Literaturzusammenstellung	3
2.1.	Geschichtliches	3
2.2.	Physiologie der Gallensäuren	4
2.2.1.	Gallensäurestruktur	4
2.2.2.	Gallensäuresynthese und Regulation	5
2.2.3.	Gallensäureaufnahme in die Leber- zelle und Sekretion	6
2.2.4.	Gallefluß	8
2.2.5.	Enterohepatischer Kreislauf (EHK), Gallensäurepool	10
2.2.5.1.	Intestinale Absorption	13
2.2.5.2.	Bakterieller Metabolismus	14
2.2.5.3.	Gallensäuren im Portalblut	15
2.3.	Funktion der Gallensäuren, Mizellen- bildung	16
2.4.	Cholestase	18
2.4.1.	Definition und Klassifikation	18
2.4.2.	Morphologische Aspekte der akuten intrahepatischen Cholestase	19
2.4.3.	Serumgallensäuren und Cholestase	21
2.4.4.	Ursachen der Cholestase	23

2.4.4.1.	Ultrastrukturelle Veränderungen	23
2.4.4.2.	Gallensäuremetabolismus	24
2.4.5.	Folgen der Cholestase	25
2.4.6.	Diagnose der Cholestase	27
2.4.6.1.	Enzymbestimmung	28
2.4.6.2.	Bilirubinbestimmung	30
2.4.6.3.	Lipoprotein-X Bestimmung	30
2.4.6.4.	Serumgallensäurebestimmung	31
2.5.	Cholestasemodelle	33
2.5.1.	Lithocholsäurecholestase	36
2.5.1.1.	Lithocholsäuremetabolismus	37
2.5.1.2.	Cholestatische Dosierungen	40
3.	Material und Methoden	42
3.1.	Reagentien und Pharmaka	42
3.2.	Tiermaterial	43
3.2.1.	Haltung und Fütterung	44
3.2.2.	Behandlung der Tiere	44
3.2.3.	Probeentnahme und Aufbereitung	44
3.2.4.	Leberbiopsie	45
3.3.	Biochemische Analysen	46
3.3.1.	Bestimmung der Serumgallensäuren	46
3.3.2.	Bestimmung des Serumgallensäure- musters mittels Dünnschichtchro- matographie	47

3.3.2.1.	Auftrennung der Gallensäuren aus dem Serum	47
3.3.2.2.	Bestimmung einer Konzentrationsreihe von Taurocholsäure	48
3.3.3.	Bestimmung des Lipoprotein-X	49
4.	Ergebnisse	50
4.1.	Physiologische Werte der Serumgallensäuren	50
4.1.1.	Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren	50
4.2.	Chronische Applikation von Lithocholsäure	50
4.2.1.	Versuchsreihe I: 10 - 160 mg LC/kg KG/Tag	52
4.2.2.	Versuchsreihe II: 160 mg LC/kg KG/Tag	52
4.2.3.	Versuchsreihe III: 160 mg LC/kg KG/Tag	52
4.2.3.1.	Serumgallensäuren	55
4.2.3.2.	Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren	55
4.2.4.	Versuchsreihe IV: 240 mg LC/kg KG/Tag	55
4.2.4.1.	Serumgallensäuren	61
4.2.4.2.	Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren	61
4.2.5.	Versuchsreihe V: 400 mg LC/kg KG/Tag	61
4.2.5.1.	Serumgallensäuren	64

4.2.5.2.	Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren	64
4.2.6.	Versuchsreihe VI: 1000 mg LC/kg KG/Tag	64
4.2.6.1.	Serumgallensäuren	66
4.2.6.2.	Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren	69
4.3.	Versuchsreihe VII: Beeinflussung der Lithocholsäurecholestase durch Clonobutin	69
4.4.	Leberbiopsie	71
4.4.1.	Versuchsreihe VI: 1000 mg LC/kg KG/Tag	72
4.4.2.	Versuchsreihe VII: 1000 mg LC/kg KG/Tag + 2 x täglich 10 mg Clonobutin/kg KG/Tag	73
4.5.	Bestimmung des Lipoprotein-X	78
4.6.	Bestimmung des Serumgallensäuremusters mittels Dünnschichtchromatographie	78
4.6.1.	R _f -Werte und Auftrennung einzelner standardisierter Gallensäuren	78
4.6.2.	Taurocholsäure-Verdünnungsreihe	81
4.6.3.	Auftrennung der Gallensäuren aus dem Serum	81
4.7.	Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen des Hundes	86

5.	Diskussion	101
5.1.	Entwicklung eines experimentellen intrahepatischen Cholestasemodells, orale Dosis von Lithocholsäure	101
5.2.	Serumgallensäuren und deren post- prandialer Anstieg als Diagnosti- kum bei der Cholestase des Hundes	104
5.2.1.	Serumgallensäuren und Serumenzyme bei der Lithocholsäurecholestase des Hundes	106
5.2.2.	Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen des Hundes	107
5.3.	Serumgallensäuremuster bei der Li- thocholsäurecholestase des Hundes	108
5.4.	Beeinflussung der Lithocholsäure- cholestase durch Clanobutin	109
5.5.	Bestimmung des Lipoprotein-X	110
6.	Zusammenfassung	112
	Summary	114
7.	Literaturverzeichnis	116

Abkürzungen

aP	alkalische Phosphatase
CDC	Chenodesoxycholsäure
C	Cholsäure
EHK	Enterohepatischer Kreislauf
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GSAF	gallensäureabhängiger Gallefluß
GSUF	gallensäureunabhängiger Gallefluß
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
γ -GT	γ -Glutamyl-Transpeptidase
KG	Körpergewicht
LP-X	Lipoprotein-X
LC	Lithocholsäure
LC-3-Sulf.	Lithocholsäure-3-Sulfat
o.b.B.	ohne besonderen Befund
RER	"rough" endoplasmatisches Retikulum
SGS	Serumgallensäuren
SER	"smooth" endoplasmatisches Retikulum
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
TCDC	Taurochenodesoxycholsäure
TC	Taurocholsäure
TLC	Taurolithocholsäure
TLC-3-Sulf.	Taurolithocholsäure-3-Sulfat

1.1. Einleitung

Die Ätiologie und Pathogenese der intrahepatischen Cholestase ist sehr komplex und trotz vieler Untersuchungen noch nicht vollständig geklärt. Besondere Schwierigkeiten bereitet die Abklärung des intrahepatischen Gallenstaus von anderen Lebererkrankungen. Eine intrahepatische Cholestase kann selbständig, als Nebenwirkung vieler Pharmaka (95) oder als Begleiterscheinung der unterschiedlichsten Erkrankungen der Verdauungsorgane auftreten (24,47,100).

In den letzten Jahren wurden umfangreiche Untersuchungen über das Phänomen der intrahepatischen Cholestase durchgeführt. Ziel war es dabei, klinisch relevante diagnostische Parameter zu finden, die auch geeignet sind, den therapeutischen Wert von Pharmaka quantitativ zu messen. Dazu war es notwendig, zunächst ein experimentelles Cholestasemodell zu entwickeln, das folgende Bedingungen erfüllt:

1. Es sollten, zumindest im Spätstadium, bestimmte histologische und ultrastrukturelle Veränderungen der Leberzelle nachweisbar sein, die für eine Cholestase charakteristisch sind.
2. Eine Dosisabhängigkeit muß erkennbar sein.
3. Das Modell muß auf Labortiere übertragbar und reproduzierbar sein.
4. Das Modell muß der Pathogenese der intrahepatischen Cholestase entsprechen.

1.2. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen geprüft werden:

1. Erzeugt Lithocholsäure, eine sekundäre Monohydroxygallensäure, beim Hund das Bild einer intrahepatischen Cholestase? Wenn ja, bei welcher subletalen Dosis?
2. Werden dabei die Bedingungen eines experimentellen Cholestasemodells erfüllt?
3. Ist der Anstieg der Serumgallensäuren und deren postprandialer Wert geeignet, eine intrahepatische Cholestase anzuzeigen?
4. Ist dem Anstieg der Serumgallensäuren oder dem Anstieg der Serumenzyme bei der Diagnostik von Leberschäden, speziell bei der Cholestase des Hundes, der Vorzug zu geben?
5. In orientierenden Versuchen sollte geprüft werden, ob das Choleretikum Clanobutin die Lithocholsäurecholestase beim Hund beeinflussen kann.
6. Welches Serumgallensäuremuster ergibt sich bei der Lithocholatcholestase des Hundes? Kann der Hund Lithocholsäure sulfatieren?

An den selben Versuchsreihen wurden von der 1. Medizinischen Tierklinik Bestimmungen der Serumenzyme und des Serumgesamtbilirubins durchgeführt.

2. Literaturzusammenstellung

2.1. Geschichtliches

Hippokrates stellte bereits fest, daß Veränderungen der Galle mit Erkrankungen in Zusammenhang stehen müssen. Er beschreibt die "schwarze oder gelbe Galle" als den Grund für viele Erkrankungen des Menschen (54).

1648 bezeichnet Van Hemont die Galle als "Balsam des Lebens, eine edle Flüssigkeit, die niemals Krankheit erzeugen kann" (54). Im 19. Jahrhundert erkannte man, daß die Galle eine heterogene Flüssigkeit ist. Die Identifizierung der einzelnen Inhaltsstoffe hat gezeigt, daß die Galle auch toxische Bestandteile enthält (92).

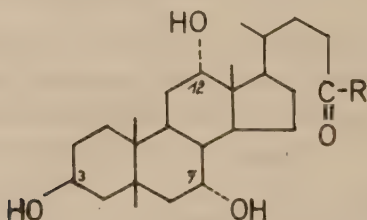
Die toxische Komponente der Galle wurde gefunden, als Holsti 1956 erstmals getrocknete Schweinegalle an Kaninchen verfütterte und eine ausgeprägte Leberzirrhose feststellte (53). Er konnte zeigen, daß diese Veränderungen auch dann auftraten, wenn er isolierte Lithocholsäure, Glykolithocholsäure oder dessen Vorstufe, die Chenodesoxycholsäure fütterte. Mit anderen Gallensäuren, wie Cholsäure z. B., war diese Leberschädigung nicht zu erreichen (52).

Die toxische Wirkung von Lithocholsäure wurde später nach oraler und parenteraler Gabe bei verschiedenen Tierspezies untersucht. Es ergab sich eine Hepatotoxizität für alle Spezies; allerdings mit unterschiedlicher Intensität (57,63,76,92,109,126,127).

2.2. Physiologie der Gallensäuren

2.2.1. Gallensäurestruktur

Gallensäuren sind Derivate der Cholansäure mit einem gesättigten Cyclopentanophenanthrenring, der 1, 2 oder 3 Hydroxylgruppen enthält. Die 3 α -Hydroxylgruppe ist allen natürlich vorkommenden Gallensäuren gemeinsam (23,29). Die aktive Form ist an die Aminosäuren Glycin oder Taurin gekoppelt, beim Menschen im Verhältnis 3 : 1 (104), bei der Ratte überwiegend an Taurin (15), beim Hund ausschließlich an Taurin (91) und beim Kaninchen hauptsächlich an Glycin (15).



Gallensäuren sind polare Lipide mit einem hydrophilen (Hydroxylgruppen, Aminosäuren) und einem hydrophoben (Steroidgerüst) Teil. Es sind Amphipate, d. h. sie sind in der Lage, in wässriger Lösung polymolekulare Aggregate, Mizellen, zu bilden (44). Die Fähigkeit, Mizellen zu bilden, ist bei den einzelnen Gallensäuren unterschiedlich. So ist Taurocholsäure ein guter Mizellenbildner, während der Dehydrocholsäure diese Eigenschaft fehlt (44).

2.2.2. Gallensäuresynthese und Regulation

Die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure werden im SER der Leberzelle aus dem Cholesterin gebildet, wobei beim Menschen pro Tag 0,78 - 1,29 mmol (300 - 500 mg) (47) Cholesterin transformiert werden. Die Gallensäuresynthese macht den Hauptteil des Cholesterinkatabolismus aus (23). Die tägliche Syntheserate von Gallensäuren steht im Gleichgewicht mit der fekalen Ausscheidung pro Tag (23,47).

Anhand von Ratten zeigte sich, daß der erste und zugleich geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Bio-transformation die 7α -Hydroxylierung des Cholesterins durch die 7α -Hydroxylase, ein mikrosomales Enzym, ist (83). Dieses Enzym unterliegt beim Menschen einem Tagesrhythmus mit der größten Aktivität am späten Nachmittag (29). Nach Sättigung der Doppelbindung erfolgt im Falle der Cholsäure eine 12α -Hydroxylierung und dann erst wird die Seitenkette durch β -Oxidation verkürzt (128). Ziel dieser Reaktion ist, das schwach polare, wasserunlösliche Cholesterin in eine stark polare lösliche Form zu überführen.

Da der tägliche fekale Verlust an Gallensäuren sehr gering ist (300 - 500 mg) (47), muß die de novo Synthese reguliert sein. Dies geschieht über einen negativen Rückkopplungsmechanismus der im Darm rückresorbierten Gallensäuren, die über die V. porta zur Leber gelangen und die von einer kritischen Konzentration an die 7α -Hydroxylase hemmen (118). Unterbrechungen dieses Kreislaufes, wie z. B. Gallefisteln oder Ileostomie, lassen die Gallensäuresynthese bis zum 10fachen steigen (18,47).

In den Mikrosomen der Hepatozyten werden die Gallensäuren an Taurin oder Glycin gekoppelt, um eine bessere Löslichkeit zu gewährleisten. Dies ist die einzige katabolische Funktion für Taurin (29). Die Konjugation verringert den pKa, so daß Gallensäuren bei niedrigem pH ionisiert vorliegen.

2.2.3. Gallensäureaufnahme in die Leberzelle und Sekretion

An der sinusoidalen Seite der Leber sorgen spezielle Aufnahmemechanismen für eine schnelle und effektive Aufnahme der resorbierten Gallensäuren aus dem Portalblut. Es ist bislang kein anderes physiologisches Aufnahmesystem mit einem so hohen Wirkungsgrad bekannt. Bei einer einzigen Leberpassage werden beim Menschen 60 % jeder beliebigen Dosis Chenodesoxycholsäure bis zu 400 mg aufgenommen (10), beim Hund sogar 92 % der Taurocholsäure (91).

An isolierten Membranen von Rattenlebern konnte gezeigt werden, daß mindestens 3 Bindungsstellen für Gallensäuren vorhanden sind (8). Für die Bindung an diese Rezeptoren scheinen die gemeinsamen Hydroxylgruppen der Gallensäuren essentiell zu sein, wie Versuche mit Dehydrocholsäure, eine synthetische Gallensäure ohne OH-Gruppen, zeigten (7). Die Ergebnisse ergaben eine hochaffine Bindungsstelle für Cholsäure, die aber auch Wechselwirkung zu anderen Gallensäuren zeigt. Dihydroxygallensäuren werden dabei schneller gebunden als Trihydroxygallensäuren. Dehydrocholat zeigte die geringste Affinität zu diesem Rezeptor. Des weiteren wurden eine Bin-

dungsstelle mit mittlerer und eine mit geringerer Affinität zu Cholsäure gefunden, die auch andere Gallensäuren binden kann (8).

Diese Gallensäurerezeptoren wurden an isolierten Rattenhepatozyten weiter charakterisiert (6). Man unterteilt heute die Gallensäureaufnahme in die Leberzelle in:

1. einen nicht sättigbaren, Na^+ unabhängigen Teil,
2. einen sättigbaren, Na^+ unabhängigen Teil,
3. einen sättigbaren, Na^+ abhängigen Teil.

Die beiden sättigbaren Komponenten sind carrier- und energieabhängig, wobei der Na^+ unabhängige Prozeß eine hohe Spezifität zu Cholsäure und Taurocholsäure zeigt (6). Der Na^+ abhängige Anteil ist heterogen, aber gallensäurespezifisch. Andere Steroide wie z. B. Östrogene werden nicht gebunden (8). Dieser Aufnahmemechanismus ist quantitativ am größten.

Der nicht sättigbare Anteil der Gallensäureaufnahme stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine passive Diffusion dar und beruht auf der Gallensäureverteilung in der Lipidphase der Membran (8).

Nach der Aufnahme werden die Gallensäuren, an Transportproteine gekoppelt, durch den Hepatozyten geschleust (134), mit Ausnahme der Primatenleber z. T. rehydroxyliert (47), um an der kanalikulären Seite zusammen mit neu synthetisierten Gallensäuren in die Kanalikuli sezerniert zu werden.

2.2.4. Gallefluß

Die in der Gallenblase gespeicherte Galle ist das Resultat folgender Vorgänge (111):

1. Gallensäureabhängiger Gallefluß (GSAF)
2. Gallensäureunabhängiger Gallefluß (GSUF)
3. Flüssigkeitstransfer durch die Desmosomen
4. Absorption und Sekretion der galleableitenden Wege einschließlich Gallenblase = duktilärer Gallefluß.

Hydromechanische Faktoren, einschließlich des arteriellen Blutdrucks, scheinen hierbei im Gegensatz zur Niere weniger wichtig zu sein als metabolische Prozesse (14).

Der gallensäureabhängige Gallefluß (GSAF) ist der Hauptanteil und die treibende Kraft des Gesamtgalleflusses und beträgt tierartlich unterschiedlich 40 - 60 %, beim Hund sogar 100 % (103). Er ist für den postprandialen Anstieg der Gallensäuren verantwortlich.

Ein aktiver carrier-abhängiger Mechanismus transportiert Gallensäuren gegen ein Konzentrationsgefälle. Im Portalblut wird dabei eine mittlere Konzentration von 13 mmol/l gemessen, während in den Kanalikuli die Konzentration 2700 mmol/l beträgt (77). Dadurch baut sich an der kanalikulären Membran ein osmotischer Gradient auf, dem ein Wassereinstrom in die Kanalikuli folgt.

Bislang glaubte man, daß für den GSAF allein der Na^+ Transport verantwortlich sei. Anwer konnte jedoch an der isoliert perfundierten Rattenleber zeigen, daß der GSAF zwar vom Kationentransport abhängt, wobei sich aber das Na^+ durch

Li^+ vollständig ersetzen ließ (4). Eine wesentliche Komponente für die treibende Kraft scheint ein Na^+ gekoppelter Cl^- Transport zu sein.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, inwieweit die Sekretion von Bilirubin und anderen organischen Anionen vom Gallensäuretransport abhängt. Sie scheinen einen gemeinsamen Mechanismus zu haben (64), Gallensäuren und Bilirubin werden zwar unabhängig voneinander sezerniert, eine Gallensäureinfusion läßt aber die Sekretionsrate organischer Anionen ansteigen (90).

Setzt man die Gallensäuresekretion in die Kanalikuli gleich Null, so bleibt ein basaler Gallefluß bestehen. Dieser GSUF beträgt bei der Ratte 50 % des Gesamtflusses (84), beim Hamster an der isoliert perfundierten Leber 75 % (70), während er beim Hund laut Preisig nicht bestehen soll (103).

Die Hauptantriebskraft für den GSUF sah man bis vor einigen Jahren noch im Na^+ Transport durch die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -abhängige ATPase. Die ursprüngliche Vermutung, daß die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in der kanalikulären Membran lokalisiert ist, konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr kann als gesichert gelten, daß dieses Enzymsystem nur an der sinusoidalen Seite der Leberzellmembran vorkommt (4). Die Tatsache, daß der GSUF durch Phenobarbital und Theophyllin gesteigert und durch Ouabain und Ethacrynsäure gehemmt werden kann, unterstützte diese Theorie (32).

Anwer gelang es 1980 (4), an der isoliert perfundierten Rattenleber das Na^+ vollständig durch Li^+ im Perfusionsmedium zu ersetzen, ohne daß dadurch der basale Gallenfluß beeinträchtigt wurde. Da Li^+ nicht in der Lage ist, die $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ zu aktivieren (4), kann behauptet werden, daß der ATPase abhängige Na^+ Transport nicht essentiell für den GSUF ist. Dies muß aber nicht bedeuten, daß in vivo der Na^+ Transport keinen Einfluß auf den Gallenfluß hat.

Anwer stellte weiter fest, daß durch Hemmung des parazellulären Kationentransportes durch Triaminopyridin auch der GSUF erheblich gesenkt werden kann, weshalb er den parazellulären Kationentransport für den GSUF verantwortlich macht (4).

Die galleableitenden Wege einschließlich Gallenblase sind in der Lage, sowohl Elektrolyte und Wasser zu resorbieren, als auch Bikarbonat zu sezernieren. Dadurch kommt es zur Konzentration der Blasengalle (107).

2.2.5. Enterohepatischer Kreislauf (EHK), Gallensäurepool

Nur ca. 5 % der sezernierten Gallensäuren werden täglich über die Faeces ausgeschieden, der Rest unterliegt wie einige andere endogen und exogene Substanzen einem enterohepatischen Kreislauf und bleibt so dem Organismus als Gallensäurepool erhalten (23). Die Größe des Pools liegt bei ca. 5 mmol (2500 mg) (47), seine Zusammensetzung ist

tierartlich unterschiedlich. So besteht bei der Ratte (73) und beim Hund (50,91) das Gallensäuremuster zur Hauptsache aus Taurocholsäure (Tabelle 1).

Man unterscheidet einen portalen und einen extraportalen enterohepatischen Kreislauf (EHK). Cholesterin und Phospholipide nehmen den Weg des extrahepatischen EHK, sie gelangen über die Darmlymphe in den systemischen Kreislauf und werden mit dem arteriellen Blut der Aa.hepaticae der Leber wieder zugeführt (12,108). Gallefarbstoffe und B₁₂-Vitamine haben einen limitierten EHK, sie werden nur z. T. im Darm rückresorbiert (40,75).

Die Gallensäuren unterliegen einem portalen EHK, sie kommen über die V.porta zur Leber zurück. Zwei Stunden nach Nahrungsaufnahme kontrahiert sich unter dem Einfluß der Hormone Cholecystokinin und Sekretin die Gallenblase, und die Gallensäuren werden in den Darm ausgeschüttet (123). Durch diese hohe Gallensäurekonzentration kommt es zum Anstieg des Serumspiegels, insbesondere dadurch, daß nach Nahrungsaufnahme auch der Lymphfluß steigt und die Gallensäuren, wenn auch nur in geringem Maß, laut Heaton über die Lymphe abtransportiert werden (47).

Pro Tag zirkuliert der gesamte Gallensäurepool bei Spezies mit Gallenblase, wie z. B. Mensch und Hund, 7 - 10x, abhängig von Art und Menge der Nahrung und ca. 2x pro Mahlzeit (13). Während des nächtlichen Fastens verbleibt fast der gesamte Pool in der Gallenblase.

Spezies	Gallensäuren	Konjugationspartner
Mensch	Cholsäure Chenodesoxychols. Desoxycholsäure (Lithocholsäure)	Glycin, Taurin
Affe	Cholsäure Chenodesoxychols. Desoxycholsäure Lithocholsäure urso-Desoxychols.	Glycin, Taurin
Vogel	Chenodesoxychols. Cholsäure	Taurin
Schwein	Chenodesoxychols. Lithocholsäure Hyocholesterolsäure (Cholsäure)	Glycin, (Taurin)
Hund	Cholsäure Chenodesoxychols. Desoxycholsäure	Taurin
Kaninchen	Desoxycholsäure Lithocholsäure Cholsäure	Glycin
Ratte, Maus	Cholsäure Chenodesoxychols. β -Muricholsäure urso-Desoxychols. Desoxycholsäure Lithocholsäure	Taurin, (Glycin)

Tabelle 1: Hauptgallensäuren der Galle von verschiedenen Spezies nach Hazlewood (46).

2.2.5.1. Intestinale Absorption

Die Reabsorption der Gallensäuren aus dem Intestinum ist im distalen Ileum zur Hauptsache ein energie- und carrierabhängiger aktiver Prozeß. Dabei werden die polareren Trihydroxygallensäuren 6 - 8x schneller resorbiert als die Dihydroxygallensäuren (114). Unkonjugierte Gallensäuren haben eine geringere Affinität zu dem Transportcarrier, werden aber durch passive Diffusion entlang des gesamten Intestinum aufgenommen (29). Der aktive Transport im Ileum ist Na^+ abhängig, sättigbar und substratspezifisch (26).

Der Anteil der passiven Diffusion von Gallensäuren ist quantitativ geringer, aber in der gesamten Länge des Darmes möglich (121). Da der pKa der taurinkonjugierten Gallensäuren kleiner als 2 ist (23), liegen sie im Darm als Anionen vor, so daß die ionische Diffusion infolge der negativen Ladung der Darmepithelien gering ist (26). Unkonjugierte Gallensäuren haben einen höheren pKa, der bei 6 liegt (23), sie sind weniger ionisiert und können via nicht-ionische Diffusion die Darm-schranke passieren (23,26). Passive Diffusion kommt demzufolge hauptsächlich im Kolon vor, d. h. nach bakterieller Dekonjugation.

Über den Weg der passiven Diffusion bleibt auch bei ileostomierten Patienten der Gallensäurepool weitgehend erhalten, da dieser Mechanismus als Kompensation des Gallensäureverlustes quantitativ in den Vordergrund rückt (88).

2.2.5.2. Bakterieller Metabolismus

Während der Darmpassage unterliegen die Gallensäuren der metabolischen Transformation durch Bakterienenzyme. Die Dekonjugation beginnt im mittleren Dünndarm und reicht bis zum Ende des Ileums. Es sind aber, zumindest beim Menschen, nur 15 % der resorbierten Gallensäuren unkonjugiert (49). Das hierbei abgespaltene Glycin wird z. T. resorbiert oder nach weiterer bakterieller Transformation ausgeschieden. 50 % Kohlenstoff des von den Gallensäuren abgespaltenen Glycins erscheinen als CO_2 in der Atemluft (49).

Durch 7α -Dehydroxylierung, die auf den Dickdarm begrenzt ist, wird die 7α -Hydroxylgruppe abgespalten. So entstehen die sekundären Gallensäuren Lithocholsäure und Desoxycholsäure. Sie werden nicht in vollem Umfang resorbiert, da sie eine geringe Affinität zu den Transportmechanismen haben. Die Desoxycholsäure erscheint beim Menschen zur Hälfte bis ein Drittel (49), die hepatotoxische Lithocholsäure nur zu einem Fünftel im Gallensäurepool (3). Der Rest wird weiter bakteriell transformiert und mit den Faeces ausgeschieden.

2.2.5.3. Gallensäuren im Portalblut

Die reabsorbierten Gallensäuren sind im Portalblut größtenteils an Albumin gebunden, wobei die einzelnen Gallensäuren unterschiedliche Affinität zur Bindungsstelle haben (17). Die Gallensäurekonzentration im Portalblut liegt beim Menschen bei $12,9 \mu\text{mol/l}$, im peripheren Kreislauf um das 2 - 3-fache niedriger (77). Postprandial steigt der portale Spiegel nur bis höchstens 50 % des Nüchternwertes (77). Dieser Anstieg ist möglicherweise deshalb so gering, da Gallensäuren auch über die Lymphe transportiert werden. Die sehr effektive Aufnahme der Gallensäuren aus der V.porta ist sicherlich auch für den niedrigen postprandialen Anstieg verantwortlich.

In der Leberzelle werden die Gallensäuren zunächst rekonjugiert und z. T. rehydroxyliert, bevor sie erneut in die Galle gelangen (47,121).

Der Verbleib der Gallensäuren in der Gallenblase ist als Schutz vor fekalen Exkretion und bakterieller Zersetzung zu sehen. Nach einer Cholecystektomie beim Menschen erscheinen infolge des vermehrten bakteriellen Angriffs mehr sekundäre Gallensäuren im Blut (96).

2.3. Funktion der Gallensäuren, Mizellenbildung

Gallensäuren sind in der Lage, auf Grund ihrer amphipatischen Eigenschaften oberhalb einer Konzentration von 1,45 mmol/l (129), die sogenannte kritische mizellare Konzentration, polymolekulare Aggregate zu bilden. Durch die Mizellenbildung werden wasserunlösliche Substanzen wie Phospholipide, Cholesterin und Monoglyceride in einer wässrigen Phase in Lösung gehalten. Die kritische mizellare Konzentration variiert bei den verschiedenen Gallensäuren und ist unter anderem auch von der Na^+ -Konzentration abhängig (19).

Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin gelangen in mizellarer Form in die Galle und werden hier so in Lösung gehalten. Dabei beeinflussen die Lipide die Mizellenbildung. Die Konzentrationen, bei der die Mizellen stabil sind, werden am deutlichsten durch ein trianguläres Koordinatensystem dargestellt (2,120). Die Mizellenbildung ist unerläßlich für die Cholesterin- und Phospholipidsekretion in die Galle (44). Der Ort der Mizellenbildung ist aber bislang nicht bekannt. Drei Möglichkeiten stehen zur Diskussion: im Hepatozyten, in der kanalikulären Membran oder erst in den Kanalikuli. Die Anwesenheit von Cholesterin und Phospholipiden in den Mizellen läßt zwar vermuten, daß dies in der kanalikulären Membran ablaufen kann, es ist jedoch unklar, ob der Vorgang von der Membranpassage abhängig ist.

Der choleretische Effekt der Gallensäuren (GSAF) wird durch die Mizellenbildung reduziert, da diese die Osmolarität der kanalikulären Galle herabsetzt. So bewirken Gallensäuren, die keine Mizellen bilden können, z. B. Dehydrocholsäure, einen größeren Anstieg des kanalikulären Gallefflusses.

Im Darm stellen Gallensäuren einen wichtigen Faktor der Verdauung und Resorption der Nahrungsfette dar (51). Die Triglyceride unterliegen zunächst durch die Pankreaslipase einer Lipolyse, wobei die Esterbindung gespalten wird (23). Gallensäuren fördern diese Lipolyse, indem sie die Pankreasenzymsekretion stimulieren, die Pankreaslipase aktivieren und den pH auf ein Optimum für diese Lipaseaktivität einstellen (11). Die so entstehenden Fettsäuren (2-Monoglyceride), das Glycerin und das Cholesterin aus Nahrung und Galle, sowie die fettlöslichen Vitamine sind in den Mizellen verteilt.

Die Resorption der Lipide in die Mukosazellen des Darmes erfolgt über zwei Barrieren: die Zellmembran und die sogenannte "unstirred-water-layer", eine Zone, die in die Phase des intestinalen Lumens übergeht (106). Dietschy konnte zeigen, daß langkettige Fettsäuren wahrscheinlich passiv über die Zone des "unstirred-water-layers" diffundieren (27). Die Gallensäuremizellen übernehmen die Rolle eines Carriers, wobei Lipide an der Mukosazelloberfläche abgegeben werden und die Mizellen für weitere Lipidinkorporation frei werden. Die Fette werden somit im Darm nicht in mizellarer Form resorbiert (29).

Des weiteren sollen Gallensäuren die Cholesterinesterase des Pankreas aktivieren und einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf die Cholesterinsynthese in der Darmwand des Ileums ausüben. Auch sollen sie für die Ausschüttung der Enterokinase der Darmepithelzellen in das Lumen verantwortlich sein (135). Des weiteren wird postuliert, daß Gallensäuren die Resorption von Kalzium, Eisen und Fremdstoffen einschließlich Pharmaka beeinflussen (131,132).

2.4. Cholestase

2.4.1. Definition und Klassifikation

Für die intrahepatische Cholestase geben Popper und Schaffner eine exakte Definition: intrahepatische Cholestase bedeutet eine Stagnation des Galleflusses durch eine gestörte Sekretion der Galle in die Kanalikuli durch die Leberzelle, ohne mechanische Verlegung. Die wichtigste Folge davon ist eine Galleretention in den Hepatozyten (111).

Man unterscheidet somit zwischen extra- und intrahepatischer Cholestase. Einer extrahepatischen Cholestase liegt stets ein mechanisches Hindernis galleableitender Wege zugrunde, wie z. B. Gallensteine, Tumoren, Entzündungsprozesse usw. Eine intrahepatische Cholestase kann ebenfalls auf Grund der selben Ursachen mechanisch bedingt sein.

Eine intrahepatische Cholestase ohne mechanische Verlegung ist dagegen viel schwieriger einzuordnen. Die Ursachen können vielfältig sein und sind größtenteils nicht geklärt. So kann bei vielen Störungen des Verdauungstraktes eine intrahepatische Cholestase auftreten, bei Hepatitiden und sämtlichen Lebererkrankungen, im letzten Drittel der Schwangerschaft oder als Nebenwirkung von Pharmaka (95,98,99).

2.4.2. Morphologische Aspekte der akuten intrahepatischen Cholestase

Die morphologischen Veränderungen der Cholestase gehen vom Gallesekretionsapparat der Hepatozyten aus (85,97), insbesondere von der kanalikulären Membran. An der sinusoidalen Membran ergeben sich keine pathologischen Befunde (84). Histologisch ist die frühe Cholestase durch Dilatation der Kanalikuli, in deren Lumen sich Gallenthromben befinden, gekennzeichnet. Daneben findet man gallepigmentierte Granula im Zytoplasma, bei längerem Bestehen auch in den Kupfer'schen Sternzellen und Makrophagen. Auf Grund des vermehrten ER kommt eosinophiles Zytoplasma vor, sowie zahlreiche binukleare Zellen (111).

Elektronenoptisch kann man als erste Veränderung bei der Cholestase eine Dilatation der Kanalikuli und strukturelle Veränderungen der Mikrovilli erkennen. Die Mikrovilli füllen als fingerförmige Ausstülpungen das Lumen der Kanalikuli, das von 2 - 3 Hepatozyten gebildet wird, fast vollständig aus. Bei Cholestase erscheinen sie geschwollen, deformiert und verkürzt oder fehlen vollständig (100). Die wenigen Mikrovilli der Desmosomen bleiben jedoch lange Zeit intakt (74). Bei der Lithocholatcholestase der Ratte kommt es zu bizarren Transformationen (85) und lamellären Veränderungen der kanalikulären Membran, die Lithocholsäure scheint die molekulare Zusammensetzung der Membran zu stören (84).

Die dilatierten Kanalikuli formen wiederum Ausstülpungen in die Hepatozyten hinein. Da dieses Bild der neonatalen Leber entspricht, in der laut Definition Cholestase herrscht, kann daraus gefolgert werden, daß bei Cholestase neue Kanalikuli entstehen (57,92,138).

Nach Popper und Schaffner kommen 4 Faktoren für die pathologisch dilatierten Kanalikuli in Frage (111):

1. ein reduzierter Membrantonus durch das Fehlen des Zytoskeletts
2. eine Verlangsamung des Galleflusses oder Gallenthromben
3. ein gesteigerter Gallefluß bei manchen Formen der Cholestase
4. Verlegungen durch Läsionen im Portaltrakt.

Auch bei gesunden Individuen ist dieses Bild partiell zu sehen (111).

In der Leberzelle selbst finden ebenfalls strukturelle Veränderungen statt. So ist das perikanalikuläre Ektoplasma, das an die Mikrovilli grenzt, erweitert, homogen und enthält einige Vakuolen. Der Golgi Apparat ist dilatiert und enthält Granula (111), ebenso wie das ER. Das Volumen des SER und RER ist unverändert, die Oberfläche aber ist um das Doppelte vergrößert (25). Dies geht mit einem Anstieg der mikrosomalen Fraktion in der Gesamtleber einher, jedoch ohne Beeinträchtigung des Protein: Phospholipid Verhältnisses. Das Cytochrom P-450 ist erheblich vermindert (25).

Das Zytoplasma enthält vergrößerte Lysosomen mit elektrodichtem Material. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Phospholipide (100). Es kommt auch fibrilläres, nicht membranumschlossenes Material vor, möglicherweise handelt es sich dabei um Bilirubin (111).

Die Desmosomen bleiben auch bei schweren Cholestasen erhalten und werden erst bei Zellnekrosen zerstört (87).

2.4.3. Serumgallensäuren und Cholestase

Der Serumgallensäurespiegel weist bei Cholestase hohe Werte auf, es wurden Konzentrationen bis zu $285 \mu\text{mol/l}$ gefunden (89). Die Synthese von Gallensäuren ist stark reduziert. So zeigte die 7α -Hydroxylase bei Patienten mit Gallengangverlegung eine Aktivität von nur 22 %, bedingt durch den intensiven Rückkopplungsmechanismus der Gallensäuren im Blut (105). Wird der Regulationsmechanismus über eine Synthesehemmung erschöpft, akkumulieren die Gallensäuren im systemischen Kreislauf. Die Folge ist ein Anstieg der renalen und fekalen Exkretion. Die Gallensäuren werden unter anderem beim Menschen in der Haut abgelagert. Der dabei auftretende Pruritus (71,89,102) wurde bei Haustieren bisher nicht beobachtet.

Ist die Aufnahme der Gallensäuren aus dem Blut in die Leberzelle gestört, so können je nach Schweregrad des Schadens durchaus noch physiologische Serumgallensäurekonzentrationen im nüchternen Zustand gemessen werden. Postprandial hingegen steigt der portale Gallensäure-

spiegel, so daß die hepatozelluläre Transportkapazität schon bei geringen Störungen überschritten werden kann. Die Folge ist dann eine Erhöhung der Serumkonzentration, die nur langsam wieder absinkt. Gründe für eine gestörte Aufnahme können Läsionen an der sinusoidalen Plasmamembran sein, eine reduzierte Sekretion an der kanalikulären Membran oder ein Mangel an intrazellulären Transportproteinen.

Alle Sekretionsstörungen an der kanalikulären Membran haben eine Erhöhung der intrazellulären Gallensäurekonzentration zur Folge. Wird dabei die Bindungskapazität von Transportproteinen überschritten, so kommt es infolge der amphipatischen Eigenschaften von Gallensäuren zur Hemmung von Enzymen des ER und von Mitochondrienfunktionen (25,58,59).

Hauptsächlich beim Menschen wurden viele Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, das Gallensäuremuster während der Cholestase zu bestimmen, um daraus Schlüsse im Hinblick auf die Pathogenese ziehen zu können. Diese Untersuchungen führten, mit Ausnahme einer verringerten Konzentration sekundärer Gallensäuren im Serum, zu keinen wesentlichen Erkenntnissen (37,47,89). Es kommen beim Menschen einige untypische Gallensäuren wie Sulfate, Glukuronide, ungesättigte Monohydroxygallensäuren und Hyocholsäure (47), bei der Ratte Ursodesoxycholsäure und β -Muricholsäure (41) und andere, z. T. noch nicht identifizierte Metabolite vor. Das kann als Schutzmechanismus gedeutet werden, da diese Verbindungen weniger toxisch sind als Monohydroxygallensäuren und renal besser ausscheidungsfähig sind.

2.4.4. Ursachen der Cholestase

2.4.4.1. Ultrastrukturelle Veränderungen

Cholestase ist ein multifaktorieller Prozeß mit verschiedenen auslösenden Ursachen, die größtenteils noch nicht geklärt sind. Da die Veränderungen alle am Gallensekretionsapparat der Hepatozyten nachweisbar sind, ist anzunehmen, daß die Cholestase zellulären Ursprung hat. Dabei werden vor allem Veränderungen des Zytoskelettes der kanalikulären Membran verantwortlich gemacht (111).

In der sinusoidalen Plasmamembran sind die Rezeptoren für den Gallensäuretransport (1,8) und die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -abhängige ATPase lokalisiert (66). Außerdem ist hier der Ort, wo das Bilirubinmonoglukuronid in das Diglukuronid transformiert wird (62).

Die kanalikuläre Membran weist im Gegensatz zur sinusoidalen bei Cholestase gravierende Alterationen auf. So sind die membrangebundenen Ektoenzyme, wie Mg-abhängige ATPase und die 5'-nucleotidase reduziert (119), während die alkalische Phosphatase erhöht ist (139).

Die verringerte Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase bei Cholestase (111), der erhöhte Gehalt an Phospholipiden und Cholesterin der kanalikulären Membran und darin abgelagerte Monohydroxygallensäuren können als Ursache in Frage kommen (84,142). Betrachtet man all diese Faktoren, so liegt der Schluß nahe, daß eine reduzierte Sekretionskapazität der kanalikulären Membran einer der auslösenden Faktoren sein könnte.

Das Zytoskelett der Membran, bestehend aus Mikrotubuli und kontraktile Aktinfilamenten, unterhält den Membrantonus, die Zellform und ist für die Gallesekretion von Bedeutung (39). Werden die Mikrofilamente z. B. durch Cytochalasin B zerstört, kommt es zur Cholestase (94). Ebenso schreibt man den cholestatisch wirksamen Sexualhormonen eine Zerstörung der Mikrofilamente zu (36).

Die Endothelien der galleableitenden Wege, z. B. der Duktuli, zeigen bei Cholestase Vakuolen und gallegigmentiertes Zytoplasma. Dieses läßt eine duktiläre Galleresorption vermuten, die in einen hepatoduktilären Kreislauf mündet (107). Die Gallengänge sind infolge Proliferationen entzündungsähnlicher Prozesse vergrößert. Auch Volumen und Formveränderungen, ausgelöst durch erhöhten intraluminalen Druck, werden beschrieben. Die so veränderten Duktuli sind von Entzündungszellen und kollagenen Fasern umgeben (16). Ein sekundär behinderter Galleabfluß ist die Folge.

2.4.4.2. Gallensäuremetabolismus

Widersprüchliche Auffassungen existieren darüber, ob eine Störung des Gallensäuremetabolismus die auslösende Ursache der Cholestase sein kann. Das SER, der Ort der Gallensäuresynthese, ist bei der Cholestase zwar hypertrophiert, aber hypoaktiv (110). Auch die Cytochrom P-450 abhängige Biotransformation von Fremdstoffen ist gestört (25). Es liegt nahe, daß das hypertrophe, hypoaktive SER mit einer gestörten Hydroxylierung des Cholesterins in Zusammenhang zu bringen ist mit vermehrt auf-

tretenden cholestatisch wirksamen Monohydroxygallensäuren (58,59). Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gallensäuresynthese, die 7 α -Hydroxylase, unterscheidet sich jedoch von den fremdstoffmetabolisierenden Enzymen dadurch, daß es nicht durch Phenobarbital stimulierbar ist. Außerdem müßte es ein Hämprotein sein, wenn es cytochromabhängig wäre. Des weiteren erscheinen Störungen der mikrosomalen Transformation bei Cholestase erst spät, so daß die Veränderungen des SER mit allen Konsequenzen eher eine Folge als eine Ursache der Cholestase sind (111).

2.4.5. Folgen der Cholestase

Die Retention von Bilirubin und Gallensäuren führt zu schweren Störungen intrazellulärer Stoffwechselvorgänge. Phospholipid- und Cholesterinretention scheinen ohne direkte pathobiochemische Konsequenzen zu sein.

Bilirubin verhindert in hohen intrazellulären Konzentrationen die Sauerstoffaufnahme in die Mitochondrien und entkoppelt so die oxidative Phosphorylierung (122). Die Cytochrome der Mitochondrien sind reduziert. Das hat einen gestörten Karbonatmetabolismus zur Folge (140). Cholsäure- und Lithocholsäureanhäufung bewirken Strukturveränderungen an den Cristae mitochondriales (84,109).

Durch die Retention der Gallensäuren kommt es zu deren Bindung an das RER. Das führt zu Hemmung der Biotransformationen von Fremdstoffen (111). Man vermutet auch eine physiologische Regulation der Cytochrom P-450 ab-

hängigen mikrosomalen Biotransformationen durch Gallensäuren (111). Auf Grund ihrer Eigenschaften als Detergentien verändern Gallensäuren in hohen Konzentrationen die Struktur des ER, woraus sich eine Reduzierung des Cytochrom P-450, eine Zerstörung der Lipoproteinbindungsstelle und eine Umwandlung in das inaktive Cytochrom P-420 ergibt (111).

Das RER ist ebenso alteriert wie das SER. Die Lipoproteinsynthese ist erhöht, ein abnormes Lipoprotein der "low density" Fraktion, das sogenannte LP-X Protein wird synthetisiert und kann beim Menschen im Serum nachgewiesen werden (116).

Die Anhäufung von Gallensäuren führt auch zur Lösung von Membrankomponenten, besonders der Phospholipide, die dann vermehrt im Serum auftauchen (33,141). Elektronenoptisch sind im Zytoplasma der Leberzelle myelinähnliche Strukturen nachweisbar, die als Folge der Anwesenheit freier Gallensäuren gedeutet werden (42).

Degenerationen, einzelne Zellnekrosen, verbunden mit reaktiven Entzündungsprozessen werden nachweisbar (100). Das ist jedoch eine Folge, nicht aber eine Ursache der Cholestase. Portale und periportale Fibrosen können sich entwickeln, zunächst erscheint Retikulin, dann Kollagen vom Typ 1. Dies kann in schweren Fällen sekundär zu einer mechanischen intrahepatischen Cholestase führen (111).

2.4.6. Diagnose der Cholestase

Die Diagnose, insbesondere die differential-diagnostische Abklärung der intrahepatischen Cholestase, ist sehr schwierig. Bislang ist kein Indikator bekannt, der die intrahepatische Cholestase spezifisch und eindeutig von anderen Lebererkrankungen trennt. Viele der bekannten Untersuchungen zeigen zwar mit mehr oder weniger großer Wahrscheinlichkeit einen Leberschaden an, die Diagnose "intrahepatische Cholestase" läßt sich aber erst dann stellen, wenn mehrere der pathologisch veränderten Parameter verglichen werden.

Die klinische Manifestation der Cholestase ist unspezifisch und erst bei länger anhaltender Erkrankung zu erkennen. Auf Grund der fehlenden Gallensäuren im Darm werden Steatorrhoe und Störungen der Darmpassage beschrieben (18). Auch kann beim Menschen Juckreiz auftreten (89,102). Inappetenz und Gewichtsverlust sind die allgemeinen Begleiterscheinungen.

Um einen extrahepatischen Verschluß der Gallenwege auszuschließen, bedient man sich der Cholangiographie und Ultraschalltomographie.

Die histologischen Veränderungen des Lebergewebes, wie z. B. Proliferation der Duktuli, vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen oder Gallethromben sind nicht immer spezifisch. Die ultrastrukturellen Alterationen der Hepatozyten und Kanalikuli, wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben, sind dagegen sicher cholestaseanzeigend. Die Entnahme von Lebergewebsproben ist jedoch risoreich (innere Blutungen, Peritonitis), und die Indikation muß sehr streng gestellt werden.

2.4.6.1. Enzymbestimmung

Die membrangebundenen Enzyme alkalische Phosphatase (aP), γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GT) und 5'-nucleotidase sind, besonders bei extrahepatischen Cholestasen des Menschen, sehr oft (102,139), aber nicht immer (67,125) erhöht. Dabei steigt zuerst die Aktivität der Serum-aP, während die γ -GT und die 5'-nucleotidase erst bei länger bestehendem Krankheitsbild erhöht sind. Die Serum-aP zeigt zwar meist zuverlässig eine Cholestase an, aber da sie auch in den Knochenmarkszellen und im Darmepithel gebildet wird, spricht eine Erhöhung nicht zwingend für eine Leberschädigung. Die Bestimmung der Isoenzyme der Serum-aP ist zwar möglich, aber aufwendig (102) und für den klinischen Laborbetrieb nur bedingt geeignet. Beim Hund zeigt die aP ebenfalls eine große Spezifität für hepatobiliäre Erkrankungen (Ausnahme Stauungsleber) und ist bei der Diagnostik von Leberschäden sehr zuverlässig (68).

Die Serum- γ -GT zeigt beim Menschen größere Spezifität für einen Leberschaden als die aP, da sie ausschließlich im Gallengangsepithel lokalisiert ist (43,139). Eine Ausnahme bilden die Cholestasen während der Schwangerschaft und bei der Einnahme von Kontrazeptiva (43). Beim Hund muß die Aussagekraft einer erhöhten Aktivität der γ -GT jedoch eingeschränkt werden, da sie auch bei gesunden Individuen, ebenso wie die aP, durch Phenobarbital und Insektizide stimuliert werden kann (68,102).

Die 5'-nucleotidase stellt einen guten Indikator für eine Cholestase dar, da sie sowohl in der sinusoidalen Membran als auch in den kanalikulären Mikrovilli lokalisiert ist (139).

Von den Transaminasen ist die Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase ein Parameter für Permeabilitätsstörungen der Leberzelle und ist im allgemeinen spezifischer als die Serum-Glutamat-Oxalat-Transaminase (43). Besonders beim Hund ist die GPT sehr leberspezifisch, da sie bei dieser Spezies hauptsächlich in der Leber lokalisiert ist. Die GOT und LDH sind beim Hund unempfindlich und unspezifisch, da sie zu einem Großteil auch im Herzmuskel lokalisiert sind und nur bei schweren Leberschäden ansteigen (68).

Die GLDH als ein mitochondriales Enzym, zeigt beim Hund Leberschäden an, die mit großem Zelluntergang verbunden sind (68).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Aktivitätsbestimmung der GPT, aP und GLDH im Serum des Hundes gut geeignet sind, eine hepatobiliäre Erkrankung zu diagnostizieren und auch über den Schweregrad eine Aussage zu treffen (68).

2.4.6.2. Bilirubinbestimmung

Bei den meisten hepatobiliären Erkrankungen des Menschen ist das Serumbilirubin als Ausdruck einer gestörten Exkretion der Leberzelle erhöht. Es kommt aber auch häufig vor, daß gerade bei Cholestasen der Serumbilirubinspiegel physiologische Werte aufweist (82,102,125). Guder beurteilt sogar die Spezifität des Serumbilirubins bei Lebererkrankungen allgemein als nur mäßig (43).

Beim Hund ist eine Hyperbilirubinurie kein charakteristisches Zeichen für einen Leberschaden, dagegen kann bei einer Hyperbilirubinämie ziemlich zuverlässig auf eine hepatobiliäre Erkrankung geschlossen werden. Physiologische Bilirubinwerte im Serum schließen jedoch einen Leberschaden nicht aus (31).

2.4.6.3. Lipoprotein-X Bestimmung

Das abnorme Lipoprotein-X (LP-X), ein Lipoprotein der "low density" Fraktion, tritt bei vielen hepatobiliären Erkrankungen mit Cholestase auf. Es ist gekennzeichnet durch einen geringen Proteinanteil von 6 %, einen hohen Anteil an Phospholipiden von 66 % und einem Cholesteringehalt von ca. 22 %, wie die Isolierung aus dem menschlichen Serum zeigte (82). Obwohl LP-X mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Cholestase anzeigt, sind auch Fälle aufgetreten, bei denen bei Patienten mit nachgewiesener intrahepatischen Cholestase (morphologischer Befund) die LP-X Bestimmung negativ ausfiel. Auch wurde LP-X bei Patienten mit chronischer Leberstauung nachgewiesen, ohne daß dabei eine Cholestase bestand (82).

2.4.6.4. Serumgallensäuren

Die Gallensäuren im peripheren Kreislauf, die beim Menschen unter physiologischen Bedingungen zwischen 5 und 9 $\mu\text{mol/l}$ liegen (47,77,115), stellen einen sehr empfindlichen Nachweis für einen Leberschaden dar. Ihre Messung zeigte sich in vielen Fällen anderen Laborbestimmungen wie Enzymaktivitätsmessung oder Bilirubinbestimmung überlegen, da sie vielfach früher und empfindlicher reagieren (37,89,92,115,125). Die Serumgallensäuren sind jedoch allein ebenfalls nicht cholestasespezifisch.

Die pathologische Erhöhung der Serumgallensäuren kommt bei eingeschränkter Leberfunktion durch einen portosystemischen Shunt zustande (115,125). Dafür können verantwortlich sein (125):

1. Eine gestörte Aufnahme der Gallensäuren aus dem Portalblut,
2. ein gestörter Transport der Gallensäuren durch die Hepatozyten,
3. eine gestörte Gallensäuresekretion in die Kanalikuli,
4. Zellnekrosen, die einen porto-systemischen Shunt unterstützen,
5. ein gestörter Transport in den galleableitenden Wegen.

Während sich bei vielen Lebererkrankungen, besonders bei chronischen und Hepatitiden, die üblichen Laborwerte wie Serumbilirubin oder Serum-GPT trotz bestehendem Krankheitsbild normalisieren und so eine Heilung vortäuschen, bleiben die Gallensäuren pathologisch erhöht (37).

Ein noch sensitiverer Nachweis für bereits minimale hepatozelluläre Dysfunktionen ist beim Menschen der postprandiale Wert der Serumgallensäuren zwei Stunden nach Nahrungsaufnahme. Es konnte vielfach gezeigt werden, daß bei nachgewiesener Erkrankung der Leber die üblichen Laborwerte und selbst die Gallensäuren im Nüchternblut physiologische Konzentrationen aufwiesen, aber die postprandialen Serumgallensäuren erheblich von der Norm abwichen (67,125). Es hat sich daher, zumindest beim Menschen, als diagnostisch wertvoll erwiesen, zunächst die Nüchternwerte der Serumgallensäuren zu bestimmen, und, falls diese keine pathologischen Befunde ergeben, die postprandialen Werte zu analysieren.

Widersprüchliche Aussagen liegen vor, inwieweit erhöhte Serumgallensäurewerte mit Serumbilirubin und den Serumenzymen korrelieren. So fand Stiehl beim Menschen keinen Zusammenhang zwischen Gallensäuren und Bilirubin im Serum und eine nur schlechte Korrelation zur alkalischen Phosphatase bei Patienten mit Hepatitis, Zirrhose, Verschußikterus und sklerotisierender Cholangitis (125). Neale konnte dagegen bei Patienten mit Hepatitis, Verschußikterus, extra- und intrahepatischer Cholestase, Alkoholzirrhose und ulzerative Kolitis eine lineare Abhängigkeit zwischen Gallensäuren und Bilirubin, nicht aber zwischen Gallensäuren und Enzymen im Serum feststellen (89).

Es wurden auch Untersuchungen des Gallensäuremusters bei Lebererkrankungen durchgeführt (37,89,92). Auch hier variieren die Ergebnisse stark, so daß auch das Gallensäuremuster differential-diagnostisch bisher ohne Bedeutung ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Serumgallensäuren und besonders deren postprandialer Wert zwar den bisher besten und sensitivsten Indikator für einen Leberschaden darstellen, aber nicht selektiv cholestasespezifisch sind.

2.5. Cholestasemodelle

Ein experimentelles intrahepatisches Cholestasemodell muß geeignet sein, die Pathophysiologie der Sekretionsvorgänge gallepflichtiger Stoffe in die Kanalikuli zu studieren. Außerdem soll es die anfangs gestellten Bedingungen an ein experimentelles Cholestasemodell erfüllen. Vielen der derzeit bekannten Modelle fehlt jedoch meist eine dieser Voraussetzungen.

Gallengangsligatur

Da die Gallengangsligatur eine extrahepatische Unterbrechung galleableitender Wege darstellt, ist sie nicht geeignet, eine intrahepatische Cholestase nachzuvollziehen. Auch fehlen hier die Membranveränderungen, die typisch für die intrahepatische Cholestase sind (74).

α -Naphthylisothiocyanat (ANIT)

Die ANIT-induzierte Cholestase zeigt Dosisabhängigkeit und ist gut reproduzierbar. Bei chronischer Applikation kommt es zu Gallengangshyperplasie und biliärer Zirrhose

(9,113). ANIT selbst ist nicht cholestatisch. Es wird an die Mikrosomen gebunden und durch die mikrosomale mischfunktionelle Oxidase entsteht ein reaktiver Metabolit, der Cholestase auslöst. Dieser Metabolit kann beim Hund nicht gebildet werden, so daß der Hund gegen ANIT resistent ist (60).

S t e r o i d e

Die Gruppe der Steroide ist sehr uneinheitlich in Bezug auf cholestatische Eigenschaften. Mit Ethinylöstradiol waren bei der Ratte keine Membranveränderungen nachweisbar (74), mit Norethandrolon kam es jedoch bei Ratte und Mensch zur Dilatation der Kanalikuli und Verlust der Mikrovilli bei Dosierungen, die eine BSP-Retention verursachen (112). Östrogene scheinen den GSUF zu hemmen und die Permeabilität der Duktuli zu erhöhen.

E r y t h r o m y c i n e

Da Erythromycin-estolat auch hepatozelluläre Nekrosen verursacht, wird es in die Gruppe der gemischt cholestatisch-hepatitischen Substanzen eingeordnet (30,95). An perfundierten Rattenlebern war eine Verminderung des Galleflusses festzustellen (69). Man vermutet in der Erythromycincholestase eine hypersensitive Reaktion.

P h e n o t h i a z i n e

Auch diese Gruppe ist auf Grund der hepatozellulären Nekrosen und hepatitisähnlichen Erscheinungen als gemischt cholestatisch-hepatitisch anzusehen. Besonders bei der Applikation von Chlorpromazin zeigen sich große Speziesunterschiede. Nach einer intravenösen Injektion von Chlorpromazin beim Hund ergaben sich eine Reduktion des Galleflusses und eine Verminderung der Galleviskosität (117), während bei der Ratte keine pathologischen Befunde festzustellen waren (95). Der Wirkungsmechanismus von Chlorpromazin kann entweder 1.) ein direkter toxischer Effekt der Substanz selbst sein, 2.) eines Metaboliten oder 3.) eine hypersensitive Reaktion.

M a n g a n

Bei der Mangan induzierten Cholestase ergeben sich eine Verminderung des Galleflusses (136) und die selben ultrastrukturellen Veränderungen, die typisch für Cholestase sind (Dilatation der Kanalikuli, Verlust der Mikrovilli, Erweiterung des Golgi Apparates usw.). Auch Zellnekrosen sind nachweisbar (137). Über den cholestatischen Mechanismus herrscht noch Unklarheit. Man vermutet eine intrakanalikuläre Präzipitation von Mangan/Bilirubin Aggregaten.

T e t r a c h l o r k o h l e n s t o f f

Durch die aus CCl_4 metabolisch entstehenden reaktiven Radikale kommt es zu reinen Parenchymschäden und Nekro-

sen. Die dabei auftretenden Sekretionsstörungen (Cholestase, erhöhte Serumgallensäuren) sind sekundär durch den umfangreichen Zelluntergang bedingt (5).

2.5.1. Lithocholsäurecholestase

Die Hepatotoxizität der Lithocholsäure wurde erstmals von Holsti nachgewiesen (52,53, siehe Kapitel 2.1.). Daß Lithocholsäure bei Ratten und Hamstern eine Cholestase mit herabgesetzter Gallensäuresekretion verursacht, wurde von Schaffner und Javitt gezeigt (65,109). Elektronenoptisch zeigten sich dabei die selben ultrastrukturellen Veränderungen wie in Kapitel 2.4.3. beschrieben.

Der Effekt von Gallensäuren auf Organe und Organellen beruht auf deren Detergenswirkung. Am besten kann diese Eigenschaft an einem Hämolysemodell nachvollzogen werden, hier zerstören Lithocholsäure und Desoxycholsäure die Erythrozytenmembran (133).

Sowohl der GSAF als auch der GSUF können bei Cholestase gestört sein. Es gibt jedoch keine Beweise, daß durch ausschließliche Hemmung des GSUF (Ethinyl-Östradiol z. B.) die morphologischen Veränderungen der Cholestase auftreten. Die Hemmung des GSUF jedoch bewirkt sekundär auch eine Reduzierung des GSAF durch Unterdrückung der Na^+ Sekretion (111).

Lithocholsäure greift am Gallesekretrationsapparat der Hepatozyten an. Da Lithocholsäure mit nur einer Hydroxylgruppe sehr lipophil ist, kann sie an der kanaliku-

lären Seite in den Mikrovilli akkumulieren (142). Sie zerstört die molekulare Struktur und reduziert die Membranpermeabilität (22,70,84,85,92). Die Folge ist eine gestörte Sekretion gallepflichtiger Stoffe.

Lithocholsäure kann zwar in Mizellen inkorporiert werden, ist aber selbst nicht in der Lage, solche zu bilden. Da die Mizellen essentiell für den Cholesterin- und Phospholipidtransport in die Galle sind, ist dieser Transport durch ein Überangebot an Lithocholsäure behindert. Auch läßt die Ablagerung von Monohydroxygallensäuren in den Mikrovilli den Cholesteringehalt der Membran steigen, so daß auch dadurch die Sekretion von Lipiden gestört ist (86). Des weiteren präzipitiert Lithocholsäure in hohen Konzentrationen in den Kanalikuli, was sekundär zu mechanischen Verlegungen der galleableitenden Wege führt (84).

2.5.1.1. Lithocholsäuremetabolismus

Lithocholsäure taucht bei gesunden Individuen in nur sehr geringen Konzentrationen auf (78,92). Im Darm wird Lithocholsäure wenig rückresorbiert (siehe Kapitel 2.2.5.2.). Bei Cholestasen und experimentellen Cholestasen mit Lithocholsäure steigt ihr Anteil erheblich. Interessant ist, daß die Leber einen Schutzmechanismus hat, der die Toxizität der Lithocholsäure verringert. Dabei wird sie tierartlich unterschiedlich metabolisiert.

Sulfatierung der 3 α - Hydroxylgruppe

Die Anwesenheit sulfatierter Gallensäuren wurde 1967 von Palmer beobachtet (93). Bei Cholestase und zur Entgiftung und Ausscheidung wird Lithocholsäure in der menschlichen Leber, aber auch bei Ratte und Hamster (70), in der 3 α -Position sulfatiert. Dadurch entsteht eine mehr polare, wasserlösliche und besser ausscheidungsfähige Form. Besonders der renale Exkretionsweg wird gefördert, die Sulfatierung verhindert auch die Rückresorption in den Nierentubuli (47). Auch die Eliminierung via Faeces nimmt zu, da mit steigender Polarisierung die passive Diffusion behindert ist (23). Durch die Sulfatgruppe sinkt die Wechselwirkung mit der kanalikulären Membran, die Lithocholsäure wird in dieser Form nicht mehr eingelagert.

Bei gesunden Individuen ist die Lithocholsäure die einzige Gallensäure, die sulfatiert erscheint, wogegen bei Cholestase auch zwei- und dreiwertige Gallensäuren als Sulfate vorliegen können (47). Die Sulfatierung ist der wichtigste metabolische Schritt. In der gesunden Galle tauchen keine Gallensäuresulfate auf, wogegen im Serum 9 % sulfatiert vorliegen, im Harn sogar 65 % (80). Bei Cholestase steigen die Werte im Serum bis zu 20 % (47).

Gallensäureglukuronide sind ebenfalls im Harn von Patienten mit Cholestase gefunden worden. Die Glukuronyltransferase der Leber, die für diese Metabolisierung verantwortlich ist, kann durch Phenobarbital induziert werden (124). So zeigte sich, daß Phenobarbital in der Lage ist, die Serumgallensäurekonzentration zu senken, indem die renale und fekale Exkretion durch vermehrte Glukuronidierung erhöht wird.

R e h y d r o x y l i e r u n g

Viele Spezies, mit Ausnahme der Primaten, können sekundäre Gallensäuren in der Leber rehydroxylieren und somit das toxische Lithocholat inaktivieren. Die Ratte z. B. hydroxyliert Lithocholsäure in der 6β -Position und es entsteht ein ungiftiger Metabolit. Da dieser Schritt eine sehr hohe Kapazität aufweist, ist die Ratte gegen exogenes Lithocholat sehr resistent, und die cholestatische Dosis ist extrem hoch (20,92). In der Hamsterleber erfolgt eine 7α -Hydroxylierung, 30 % exogener Lithocholsäure wird so zu Chenodesoxycholsäure transformiert (70). Bei Hühnern erfolgt eine Umwandlung zur Desoxycholsäure und Cholsäure auf Grund einer 12α -Hydroxylierung (92).

S p e z i e s o h n e E n t g i f t u n g s m e c h a - n i s m u s

Keinen ausreichenden Schutzmechanismus gegen Lithocholsäure scheinen Affen zu besitzen, da bei dieser Spezies die Sulfataseaktivität in der Leber sehr gering ist. Ein anderer Entgiftungsmechanismus liegt nicht vor, so daß geringe Dosen von Lithocholsäure bereits letal sind (20, 38).

2.5.1.2. Cholestatische Dosierung von Lithocholsäure

Da der Lithocholsäuremetabolismus große Speziesunterschiede zeigt und auch unterschiedlich effektiv ist, ist auch die cholestatische subletale Dosis tierartlich verschieden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf orale Applikation:

R a t t e , M a u s , M e e r s c h w e i n c h e n

Auf Grund der sehr effektiven 6β -Hydroxylierung ist die Ratte am unempfindlichsten gegen Lithocholsäure, erst 1000 mg LC/kg KG sind cholestaseauslösend, ebenso bei der Maus und beim Meerschweinchen (20,57).

H a m s t e r , K a n i n c h e n

Da der Schritt der 7α -Hydroxylierung der Lithocholsäure keine so hohe Kapazität hat, genügen bei diesen Tieren 250 mg LC/kg KG, um eine Cholestase zu verursachen (57).

H u h n

Gleiches gilt für die Spezies Huhn, hier wirken bereits 200 mg LC/kg KG cholestatisch (34).

A f f e

Hunt beschreibt, daß Affen bei Dosen von 400 - 600 mg LC/kg KG nach 24 Tagen ad exitum kamen. Rhesusaffen sind schon bei 250 mg LC/kg KG gestorben, da sie Lithocholsäure nicht entgiften und ausscheiden können (55).

H u n d

Lithocholsäure ist für den Hund hepatotoxisch (61), exakte Dosisangaben liegen aber nicht vor.

3. Material und Methoden

3.1. Reagentien und Pharmaka

<u>Substanzen</u>	<u>Hersteller</u>
Clanobutin (4,4'-(chlor-N-(4-methoxy-phenyl)-benzamido) Buttersäure	Byk Gulden
Cholsäure	Calbiochem
Chenodesoxycholsäure	Calbiochem
DC-Kieselgelfertigplatten	Merck
3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase	Sigma
Lithocholsäure	Sigma
Lithocholsäure-3-Sulfat	Calbiochem
LP-X Radiophor Elektrophorese Gerät	Immuno Diagnostika
β -NAD	Sigma
NAD-Diaphorase	Sigma
Resazurin	Serva
Taurochenodesoxycholsäure	Calbiochem
Taurocholsäure	Sigma
Taurolithocholsäure	Calbiochem
Taurolithocholsäure-3-Sulfat	Calbiochem

Alle weiteren Substanzen wurden analysenrein von der Firma Merck bezogen.

3.2. Tiermaterial

Die Versuche der Reihen I und II wurden an fünf männlichen und einem weiblichen Bastard mit einem Körpergewicht von 19 - 30 kg durchgeführt. Das Alter der Tiere konnte nicht genau festgestellt werden, die Hunde waren aber mit Sicherheit älter als 4 Jahre. Diese Tiere standen schon früher im Versuch. Die Art der Versuche konnte nicht mehr ermittelt werden.

Um den Einfluß des Geschlechts auf die Ergebnisse (Östrus z. B.) und um eine eventuell bestehende Leberschädigung durch vorausgegangene Versuche auszuschließen, wurden bei der Versuchsreihe III vier männliche unvorbehandelte Bastarde verwendet. Auch hier war das Alter nicht bekannt, lag aber über 3 Jahre. Die Hunde wogen zwischen 25 und 30 kg.

Für die Versuchsreihen IV bis VII standen insgesamt sechs männliche Beagelhunde im Alter von einem Jahr zur Verfügung. Die Tiere waren nicht vorbehandelt. Pro Versuch wurden abwechselnd jeweils drei Hunde eingesetzt, so daß die Tiere eine Versuchspause von mindestens 4 bis 5 Wochen hatten. Das Körpergewicht betrug zu Anfang jeder Versuchsreihe zwischen 9,5 und 12 kg.

Zugekaufte Tiere hatten eine Adaptationszeit von mindestens vier Wochen, um sich an das neue Milieu zu gewöhnen.

3.2.1. Haltung und Fütterung

Die Bastarde waren in Einzelboxen untergebracht, die Beagelhunde wurden in Gruppen von jeweils drei Tieren gehalten. Sie wurden zweimal täglich in einen Auslauf geführt. Gefüttert wurde den Bastarden pro Tag jeweils morgens 1 Dose Pal, den Beagelhunden 1/2 Dose, mit Reis oder Flocken vermischt. Wasser erhielten sie ad libidum.

3.2.2. Behandlung der Tiere

Die Tiere erhielten täglich morgens zur gleichen Zeit nüchtern oral Lithocholsäure, die in Gelatinekapseln eingewogen wurde. Um eine gute Resorption der Lithocholsäure zu gewährleisten, wurden sie erst eine Stunde später gefüttert. Bei Versuch VII bekamen die Hunde neben 1000 mg LC/kg KG/Tag morgens zusätzlich noch zweimal täglich 10 mg Clanobutin/kg KG/Tag ab dem 6. Tag der Lithocholsäuregabe, ebenfalls in Gelatinekapseln eingewogen. Diese Dosis wird vom Hersteller für den Hund als choleretisch wirksam angegeben.

Zu Beginn einer Versuchsreihe und am Ende wurden die Tiere gewogen. Auch die Temperatur wurde zeitweilig gemessen.

3.2.3. Probeentnahme und Aufbereitung

Die Blutentnahme erfolgte aus der V.cephalica täglich jeweils morgens an den nüchternen Tieren, noch vor der Lithocholsäuregabe.

Die Proben für die Bestimmung der postprandialen Werte der Serumgallensäuren wurden 1, 2 und 4 Stunden nach Nahrungsaufnahme genommen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Tiere in 10 Minuten ihre Mahlzeit beendet hatten. Bei der Versuchsreihe VI konnten die postprandialen Werte nur teilweise, bei VII nicht mehr bestimmt werden, da die Tiere jede Nahrung verweigerten.

Nach Zentrifugieren bei $1307 \times g$ wurde das so gewonnene Serum in 1,5 ml Einweggefäße bei minus 20°C bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren (89).

Für die Bestimmung des LP-X wurde das Serum frisch verwendet, da dieses Lipoprotein nicht kältestabil ist.

3.2.4. Leberbiopsie

Am Ende der Versuchsreihen VI und VII wurde bei allen sechs Hunden eine Leberblindpunktion vorgenommen ^{x)}. Die Proben wurden zunächst in physiologischer Kochsalzlösung konserviert. Nach Fixierung in Glutaraldehyd und weiterer Aufbereitung (101) wurden Semidünnschnitte von

x) Frau Dr. S. Geyer von der 1. Medizinischen Tierklinik der Universität München war so freundlich, in dankenswerter Weise die Leberpunktion durchzuführen.

1 μ m mit Toluidinblau/Safraninlösung gefärbt und weitere Ultradünnschnitte von 150 nm mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert ^{xx)}).

3.3. Biochemische Analysen

3.3.1. Bestimmung der Serumgallensäuren

Die Gesamtserumgallensäuren wurden fluorimetrisch in Anlehnung an die Methode von Mashige gemessen (81). Meßansatz: 0,1 ml Serum, 2,0 ml Trispuffer (0,05 mol/l), 0,5 ml NAD-Diaphorase, 0,2 ml Resazurinlösung (0,1 mmol/l) und 0,2 ml 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (0,005 E/ml). Die Messungen wurden mit Hilfe eines Perkin-Elmer-Fluoreszenzspektrometers MPF-4 nach Anregung bei 560 nm bei einer Emission von 580 nm durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Bestimmung der Gallensäuren in einem Konzentrationsbereich von 1 - 40 nmol/ml. Bei höheren Konzentrationen mußten die Serumproben mit Aqua bidest. verdünnt werden, da die Eichkurve nicht mehr linear verläuft. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

xx) Für die Aufbereitung und die elektronenoptische Bewertung der Proben bedanke ich mich bei Herrn Dr. A. Pospischil vom Institut für Tierpathologie der Universität München.

Das Prinzip dieser Gallensäurebestimmung beruht auf der enzymatischen Abspaltung des Wasserstoffatoms der 3α -Hydroxylgruppe durch die 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase. Dieser Wasserstoff wird auf NAD übertragen und mit Hilfe der Diaphorase auf den Fluoreszenzfarbstoff Resazurin. Dabei entsteht der Farbstoff Resorfin, der nach Anregung bei 560 nm bei 580 nm fluorimetrisch bestimmt werden kann. Das gebildete Resorfin ist der Konzentration von 3α -Hydroxygallensäuren direkt proportional.

3.3.2. Bestimmung des Serumgallensäuremusters mittels Dünnschichtchromatographie

3.3.2.1. Auftrennung der Gallensäuren aus dem Serum

Da die Auftrennung der Gallensäuren durch Dünnschichtchromatographie nur Bestimmungen im mikromolaren Bereich erlaubt (Abb. 14), mußten vergleichbare Proben vor dem Auftragen auf die Dünnschichtplatten gesammelt und extrahiert werden.

Es wurden jeweils 3 bis 4 Serumproben gesammelt, so daß eine Menge von ca 4 ml zur Verfügung stand. Ein Methanol-Äthanolgemisch (1:1) wurde im Verhältnis 1 Teil Probe zu 4 Teilen Gemisch tropfenweise zugegeben und 10 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz 15 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert, danach 15 Minuten in Eis gekühlt und bei $12\,000 \times g$ zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Präzipitat mit Methanol resuspendiert, wiederholt bei 37° C inkubiert und ge-

kühlt. Beide Überstände wurden zusammen bei 37°C eingedampft und in 0,1 ml Methanol gelöst. Davon wurden jeweils 0,005 bzw. 0,01 ml auf Kieselgelfertigplatten (Schichtdicke 0,25 cm) aufgetragen.

Als Fließmittel wurde für die Bestimmung der unkonjugierten Gallensäuren ein Gemisch aus 50 Teilen Toluol, 50 Teilen Essigsäure und 10 Teilen Aqua bidest. verwendet (130). Für konjugierte Gallensäuren und sulfatierte Gallensäuren eignete sich ein Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest.-gemisch im Verhältnis 65:24:15:9 (21). Die Laufzeit betrug bei dem Chloroformgemisch ca. 90 Minuten, bei dem Toluolfließmittel 4 Stunden.

Vor dem Auftragen der Proben wurden die Kieselgelplatten 30 Minuten bei ca. 40°C aktiviert. Die dann aufgetragenen Proben wurden erst einem Vorlauf in Petroläther unterzogen, da dadurch störende Lipide extrahiert werden, die Steroide dagegen am Auftragungsort verbleiben.

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte teilweise zweidimensional. Nach dem Trocknen wurden die Platten in der Jodkammer angefärbt.

3.3.2.2. Bestimmung einer Konzentrationsreihe von Taurocholsäure

Standartisierte Taurocholsäure wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in Methanol gelöst und auf Kieselgelfertigplatten aufgetragen. Nach Verbringen in das Fließmittel mit Chloroform und Trocknen der Platten wurde die Taurocholsäure mit Joddämpfen sichtbar gemacht und die

markierten Felder großzügig ausgekratzt. Nach Zugabe von 1 ml Glycinpuffer (1 mol/l) wurde die Suspension 1/2 Stunde geschüttelt und bei 12 000 x g zentrifugiert. Dann wurden 0,05 ml NAD-Lösung (10 mg/ml) und 0,05 ml 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (10 E/7ml) zupipettiert, 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, nochmals 15 Minuten geschüttelt und 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 334 nm gegen Aqua bidest. gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.3.3. Bestimmung des Lipoprotein-X

Die Bestimmung des LP-X erfolgte in einem LP-X Radio-phor Elektrophoresegerät, das von der Firma Immuno Diagnostika gebrauchsfertig geliefert wird. Es kann dabei aber nur eine qualitative Beurteilung von 1/2+ bis 3+ erfolgen. Man nützt dabei die Eigenschaft des LP-X, in ungereinigtem Agar elektrophoretisch zur Kathode zu wandern, im Gegensatz zu allen anderen Lipoproteinen, die in diesem Medium zur Anode wandern. Nach einer Elektrophoresezeit von 30 Minuten wird mit Puffer fixiert und die Präzipitationsbanden können unter der Lupe abgelesen werden.

4. Ergebnisse

4.1. Physiologische Werte der Serumgallensäuren

Anhand von 21 gesunden Hunden unterschiedlichen Alters und Geschlechts konnte ein physiologischer Mittelwert der Gallensäuren im peripheren Kreislauf von $7,92 \text{ nmol/ml} \pm 3,99$ ermittelt werden. Dies entspricht ziemlich exakt den Werten, die für den Menschen beschrieben sind (77, 115).

4.1.1. Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren

Der Anstieg der Serumgallensäuren 1, 2 und 4 Stunden nach Nahrungsaufnahme entspricht den beim Menschen gefundenen Werten (Abb. 1) (47). Der postprandiale Anstieg liegt auch bei gesunden Hunden nicht mehr als die Hälfte bis ein Drittel über dem Nüchternwert.

4.2. Chronische Applikation von Lithocholsäure

In den folgenden Versuchen sollte herausgefunden werden, bei welcher oralen Dosis Lithocholsäure beim Hund einen Anstieg von Serumgallensäuren als ein Kriterium der Cholestase erzeugt. Da für den Hund Literaturhinweise über diese toxische Dosis fehlen, wurden zunächst $10 \text{ mg LC/kg KG/Tag}$ verabreicht.

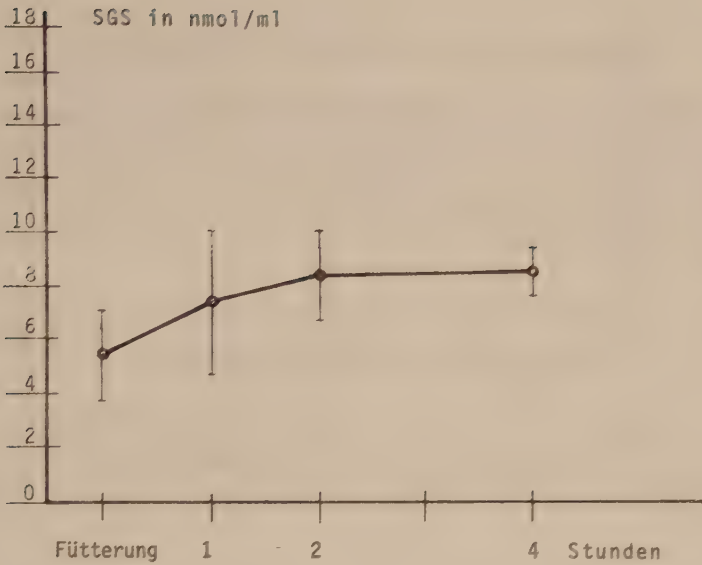


Abb. 1: Physiologische Werte des postprandialen Anstiegs der Serumbile Säuren in nmol/ml bei 4 gesunden Hunden ($n = 4$), 1, 2 und 4 Stunden nach Fütterung.

4.2.1. Versuchsreihe I: 10 - 160 mg LC/kg KG/Tag

Ein männlicher und ein weiblicher Bastard erhielten jeweils 5 - 9 Tage 10, danach 20, 40, 80, 100, 120, 160 mg LC/kg KG/Tag per os. Eine Dosis von 160 mg LC/kg KG/Tag bewirkte einen deutlich meßbaren Anstieg der Serumgallensäuren (Abb. 2).

4.2.2. Versuchsreihe II: 160 mg LC/kg KG/Tag

Die Dosis von 160 mg LC wurde vier Hunden verabreicht. Zur Verfügung standen drei männliche und ein weiblicher Bastard, die 9 bzw. 24 Tage lang 160 mg LC/kg KG/Tag erhielten.

Das Allgemeinbefinden der Tiere war gut, es war weder eine Appetitminderung noch ein Gewichtsverlust festzustellen. Wie aus Abb. 3 zu entnehmen ist, erreichten die Serumgallensäurewerte mit Ausnahme des weiblichen Hundes Konzentrationsbereiche, die bis zum 32-fachen über dem Normbereich lagen.

4.2.3. Versuchsreihe III: 160 mg LC/kg KG/Tag

Um eine eventuelle Leberschädigung durch frühere Versuche auszuschließen, wurde der Versuch (160 mg LC/kg KG/Tag) an vier weiteren gesunden, unvorbehandelten Hunden wiederholt. Die Versuchsdauer betrug 26 Tage.

Das Allgemeinbefinden der Tiere war bis zum Ende des Versuches unverändert gut.

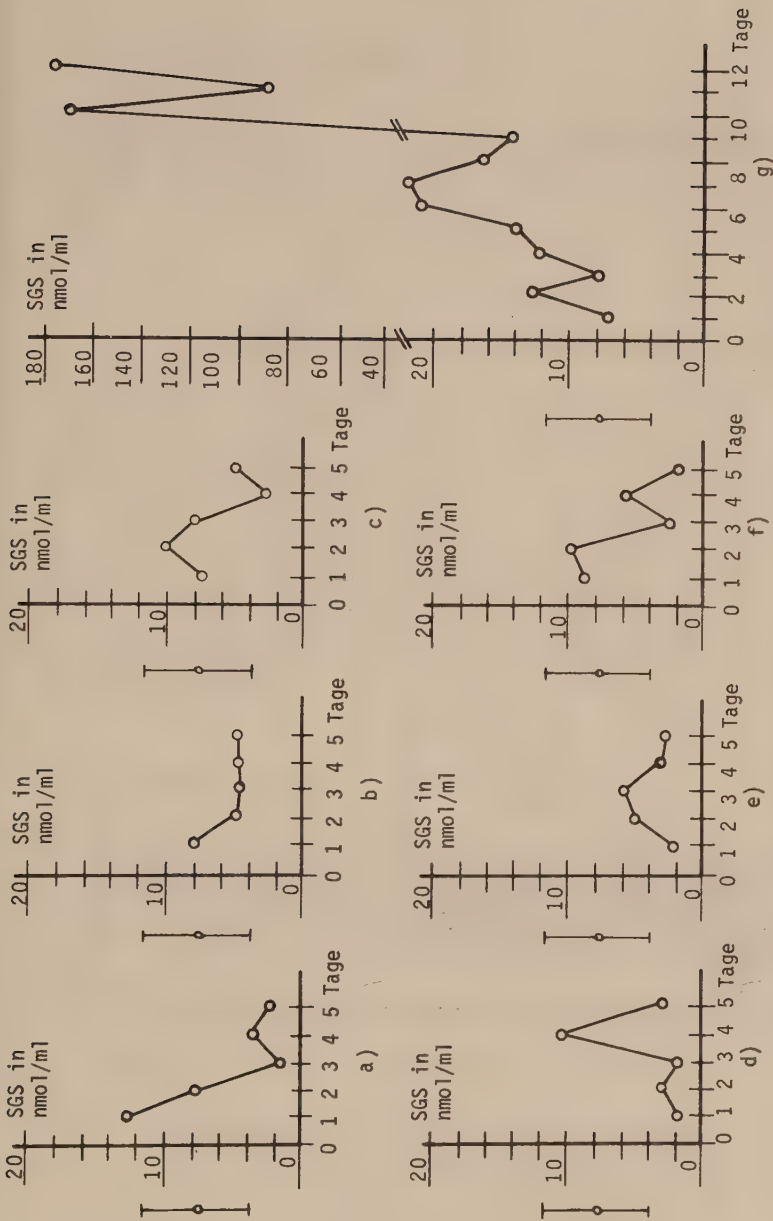


Abb. 2: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von a) 10 mg LC, b) 20 mg LC, c) 40 mg LC, d) 80 mg LC, e) 100 mg LC, f) 120 mg LC, g) 160 mg LC/kg KG/Tag per os.

⏏ = Normbereich

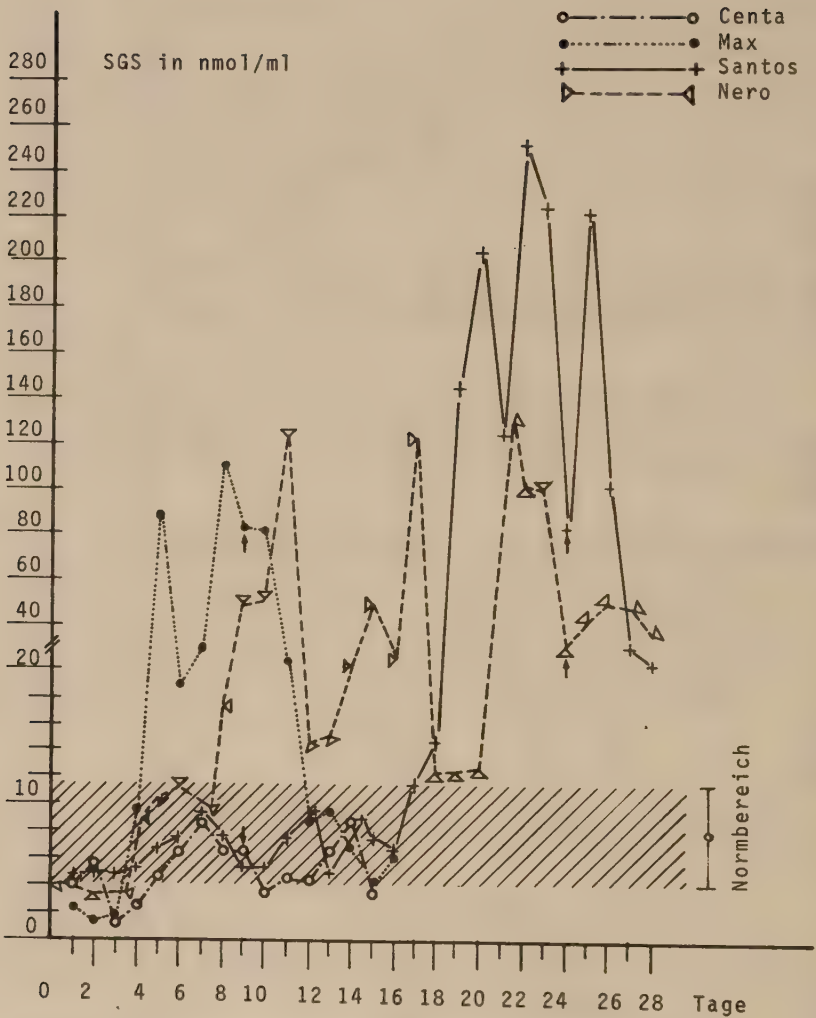


Abb. 3: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von 160 mg LC/kg KG/Tag per os.

↑ = letzte LC-Gabe

4.2.3.1. Serumgallensäuren

Es zeigte sich nur bei einem Hund eine deutliche Erhöhung der Gesamtserumgallensäuren ab dem 11. Tag (Abb. 4). Dieses Tier war älter, nach Zähnen, Haarkleid und Temperament konnte es auf ca. 10 Jahre geschätzt werden

4.2.3.2. Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren

Vom 2. bis zum 20. Tag wurde bei dieser Versuchsgruppe jeden zweiten Tag auch der postprandiale Anstieg der Serumgallensäuren gemessen. 6 Tage nach der Applikation der Lithocholsäure konnte bei dem 2-Stundenwert eine deutliche Abweichung von der Norm festgestellt werden (Tabelle 2). Im weiteren Versuchsverlauf nahm der Anstieg weiter zu. Bei dem Hund Schorschi war am 15. Tag der 1-Stundenwert mit 596,14 nmol/ml um den Faktor 75 über dem Normwert.

4.2.4. Versuchsreihe IV: 240 mg LC/kg KG/Tag

In diesem, wie auch in den folgenden Versuchen, wurden ausschließlich männliche Beagelhunde verwendet. Zunächst bekamen drei Hunde 15 Tage lang 240 mg LC/kg KG/Tag. Auch bei dieser Dosis wiesen die Tiere einen guten Allgemeinzustand auf.

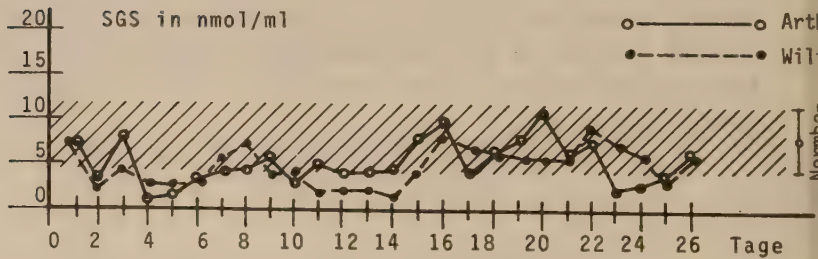
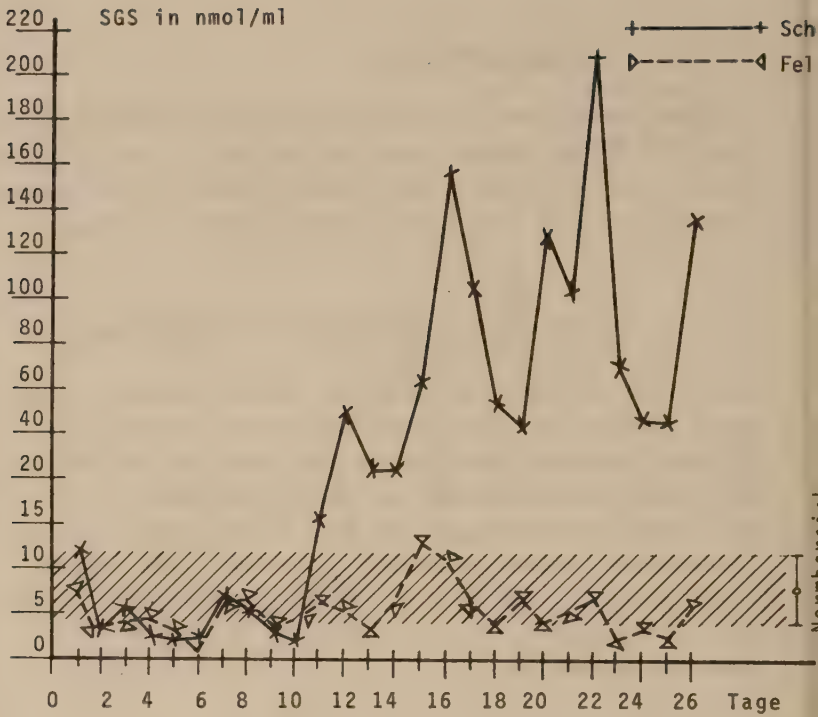


Abb. 4: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von 160 mg LC/kg KG/Tag per os.

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	4,33	11,19	14,80
Felix	4,09	11,19	10,25
Schorsch	5,41	10,35	9,26
Wilfried	7,70	17,08	14,80

2. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	2,58	19,40	10,30
Felix	3,12	4,32	4,96
Schorsch	2,11	9,56	7,18
Wilfried	2,57	11,59	10,40

4. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	5,58	-	19,99
Felix	6,66	-	8,52
Schorsch	7,25	-	11,27
Wilfried	4,02	-	11,86

6. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	4,06	26,79	14,72
Felix	3,65	6,80	6,29
Schorsch	3,24	7,51	10,86
Wilfried	5,48	17,86	15,93

8. Tag

Fortsetzung Seite 58 - 59

Tabelle 2: Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren
in nmol/ml nach Gabe von 160 mg LC/kg KG/Tag
per os, 1 und 2 Stunden nach Fütterung.

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	2,47	5,87	15,31
Felix	5,13	21,37	8,25
Schorsch	51,35	149,23	217,03
Wilfried	4,31	16,96	13,57

11. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	1,59	16,45	14,86
Felix	6,39	19,46	13,26
Schorsch	24,63	64,00	146,70
Wilfried	4,41	26,98	14,85

13. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	8,52	28,69	33,89
Felix	11,54	23,80	15,07
Schorsch	156,97	596,14	284,14
Wilfried	9,98	86,35	94,71

15. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	5,90	33,54	21,14
Felix	6,49	17,80	15,14
Schorsch	40,32	125,90	110,16
Wilfried	7,96	90,49	141,64

18. Tag

Fortsetzung Tabelle 2

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung		
	Fütterung	1	2
Arthur	5,15	36,33	30,29
Felix	5,50	34,73	19,27
Schorsch	101,27	483,26	449,50
Wilfried	6,13	39,97	52,41

20. Tag

Fortsetzung Tabelle 2

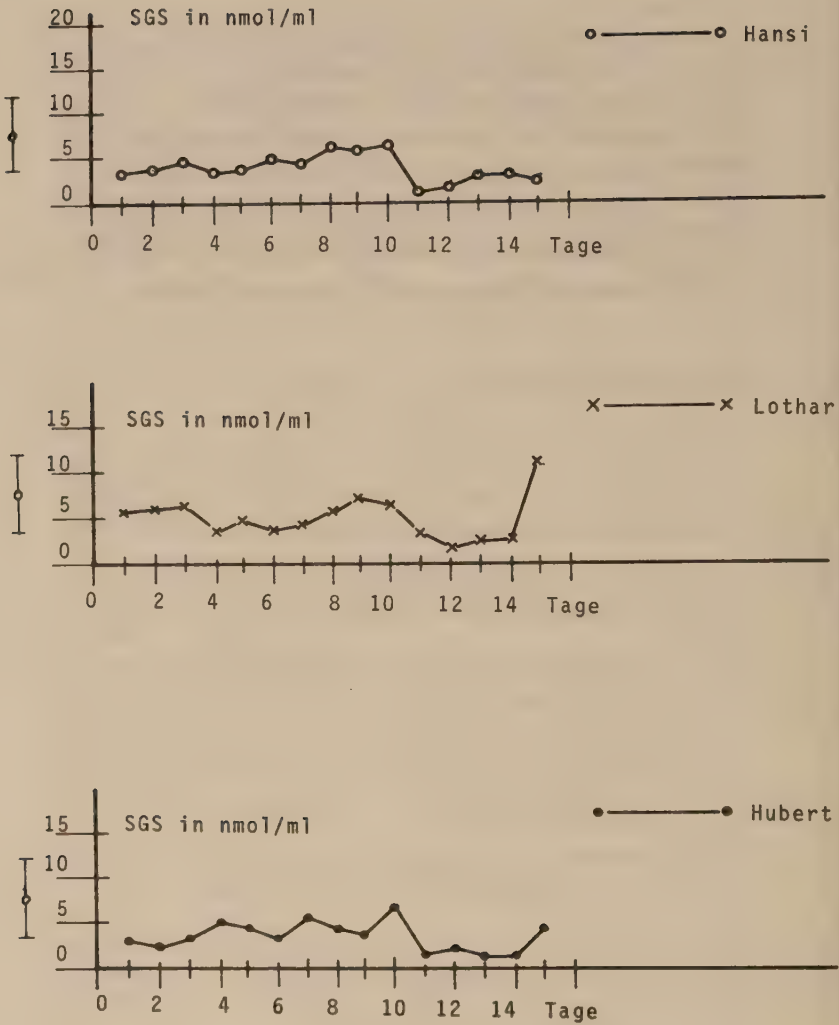


Abb. 5: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von 240 mg LC/kg KG/Tag per os.

⊢ = Normbereich

4.2.4.1. Serumgallensäuren

Bei dieser Versuchsgruppe konnte trotz der höheren Dosis kein Anstieg der Serumgallensäuren im nüchternen Zustand nachgewiesen werden (Abb. 5).

4.2.4.2. Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren

Die postprandialen Werte wurden bei dieser Versuchsserie am 8., 11. und 15. Tag der Lithocholsäuregabe gemessen. Die Ergebnisse waren uneinheitlich. Sie zeigten eine allgemein zunehmende Tendenz; insbesondere 1 Stunde nach Nahrungsaufnahme, blieben jedoch mit Ausnahme des Hundes Lothar noch im Normbereich (Tabelle 3).

Von Bedeutung ist, daß trotz der pathologischen postprandialen Werte (Hund Lothar) die Nüchternwerte der Serumgallensäuren im physiologischen Konzentrationsbereich lagen.

4.2.5. Versuchsreihe V: 400 mg LC/kg KG/Tag

Drei Beagelhunde erhielten 15 Tage lang 400 mg LC/kg KG/Tag. Ab dem 3. Tag der Lithocholsäurefütterung trat bei dem Hund Lupo leichter Appetitmangel auf. Trotzdem zeigten alle drei Tiere ein gutes Allgemeinbefinden. Es trat kein Gewichtsverlust auf.

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	4,77	11,50	11,95	11,33
Lothar	5,49	16,20	20,36	31,15
Hansi	6,19	17,88	16,28	11,33

8. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	1,55	21,13	5,64	7,60
Lothar	3,70	51,02	32,04	25,81
Hansi	0,68	9,64	9,05	11,69

11. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	4,00	21,07	12,32	6,63
Lothar	10,75	166,06	126,43	158,50
Hansi	2,63	9,58	14,12	11,27

15. Tag

Tabelle 3: Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren
in nmol/ml nach Gabe von 240 mg LC/kg KG/Tag
per os, 1, 2 und 4 Stunden nach Fütterung.

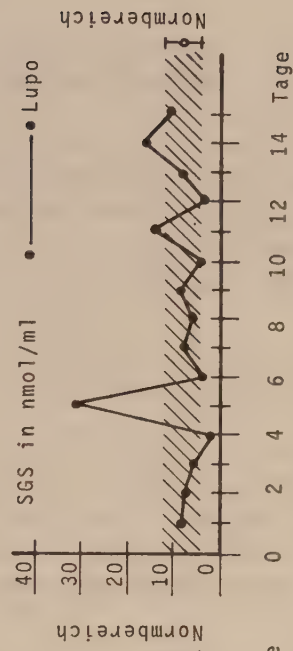
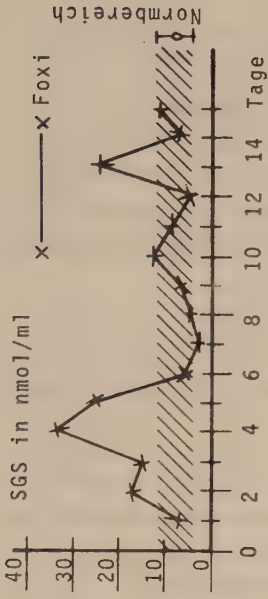
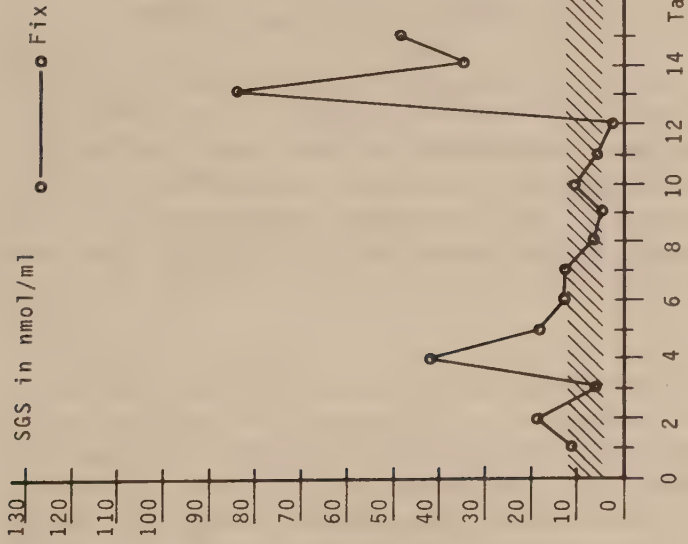


Abb. 6: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von 400 mg LC/kg KG/Tag per os.

4.2.5.1. Serumgallensäuren

Am 4. bzw. 5. Tag zeigte sich ein leichter aber deutlicher Anstieg der Serumgallensäuren bis 42,79 nmol/ml, der sich im weiteren Verlauf der Behandlung normalisierte. Bei dem Hund Fix war am 14. Tag ein zweiter Anstieg auf 84,11 nmol/ml nachweisbar (Abb. 6).

4.2.5.2. Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren

Die postprandialen Werte wurden bei dieser Versuchsreihe am 3., 7. und 10. Tag gemessen. Sie zeigten bereits ab 3. Tag Werte, die Hinweise auf einen Leberschaden geben (Tabelle 4). Bei der Dosis von 240 mg LC/kg KG/Tag war dieser Effekt erst ab 8. Tag festzustellen.

4.2.6. Versuchsreihe VI: 1000 mg LC/kg KG/Tag

Obwohl die Ermittlung der postprandialen Werte auch bei niedrigen Dosen von Lithocholsäure für einen deutlich nachweisbaren Leberschaden spricht, waren die Nüchternwerte weitgehend im Normbereich. Die nachfolgende Versuchsreihe sollte zeigen, ob mit einer hohen Dosis Lithocholsäure auch die Nüchternwerte erhöht sind. Drei Beagelhunde erhielten 20 bzw. 15 Tage lang 1000 mg LC/kg KG/Tag.

Der Verlauf einer ausgeprägten Cholestase wurde in dieser Versuchsreihe auch durch das klinische Bild gekennzeichnet. Die Tiere hatten extrem gelbe Schleimhäute, verbunden mit einer starken Bilirubinämie. Es stellte sich eine anhaltende Inappetenz ein, am 17. bzw. am 10. Tag verweigerten die Tiere jegliche Nahrungsaufnahme.

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Fix	5,62	10,48	52,96	96,80
Foxi	15,68	13,64	12,86	14,91
Lupo	5,28	20,71	19,77	16,36

3. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Fix	12,95	16,68	25,24	20,34
Foxi	3,07	13,18	20,61	46,02
Lupo	8,44	74,99	87,78	80,11

7. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Fix	10,68	15,76	25,66	33,23
Foxi	12,05	18,04	19,93	27,53
Lupo	5,48	121,52	73,10	62,66

10. Tag

Tabelle 4: Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren
in nmol/ml nach Gabe von 400 mg LC/kg KG/Tag
per os, 1, 2 und 4 Stunden nach Fütterung.

Damit ging ein starker Gewichtsverlust von durchschnittlich 20 % einher. Am 3. Tag nach Verweigerung der Nahrungsaufnahme wurde die Lithocholsäure abgesetzt.

Die Inappetenz durch Lithocholsäure ist auch in der Literatur beschrieben (57). Der eintretende Gewichtsverlust kommt infolge ungenügender Nahrungsaufnahme zustande.

Trotz des schlechten Allgemeinzustandes waren die Tiere nach wie vor temperamentvoll und munter. Der beim Menschen auftretende Pruritus bei Cholestase durch in der Haut abgelagerte Gallensäuren (71) war bei keinem der Versuchstiere zu beobachten. Auch der beschriebene pyrogene Effekt von Lithocholsäure (28) trat bei keinem der Versuchstiere auf.

4.2.6.1. Serumgallensäuren

Zwischen dem 2. und 5. Tag stiegen die Serumgallensäuren bis zu Konzentrationen von 358,87 nmol/ml und blieben während der gesamten Versuchszeit pathologisch erhöht (Abb. 7).

Bereits 7 Tage nach Absetzen der Lithocholsäure erreichten die Serumgallensäuren wieder physiologische Werte (Abb. 7). Nach Absetzen der Noxe, Lithocholsäure, ist der gesetzte Leberschaden offensichtlich weitgehend reversibel (56,109).

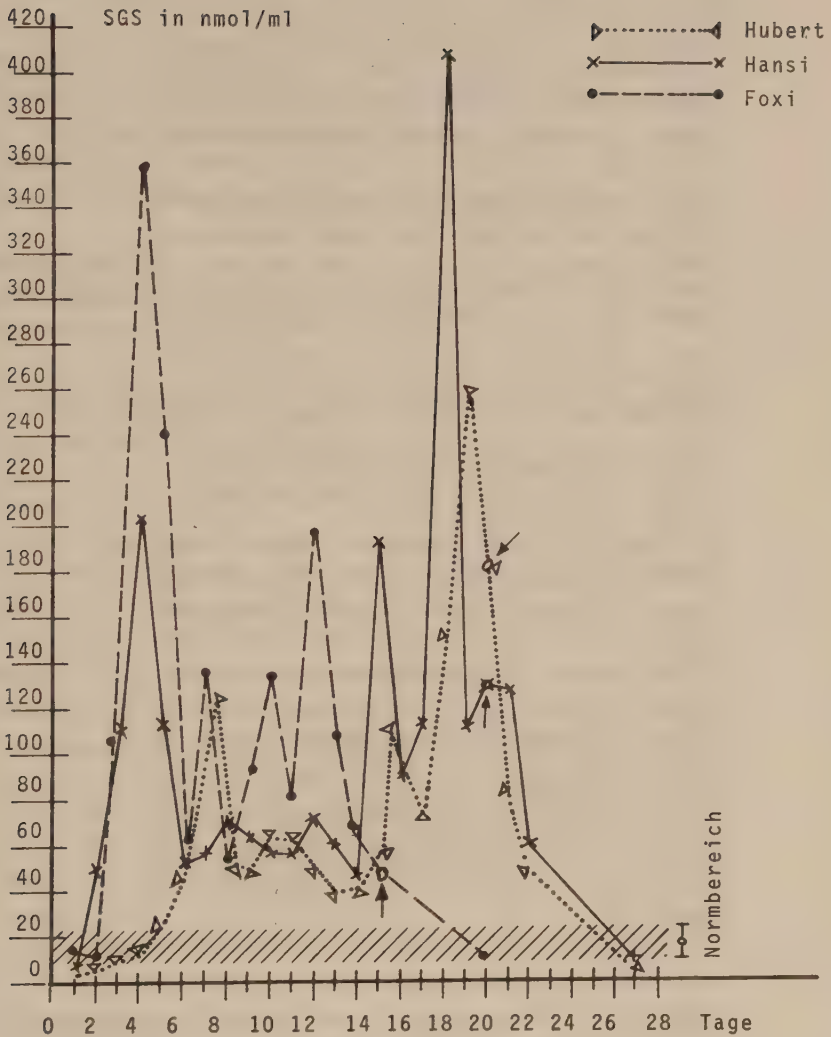


Abb. 7: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von 1000 mg LC/kg KG/Tag per os. ↑ = letzte LC-Gabe

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	8,94	132,55	568,63	130,63
Hansi	109,49	535,97	503,31	681,96
Foxi	107,47	70,09	397,19	336,45

3. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	44,72	399,57	526,36	378,44
Hansi	52,17	94,17	121,02	134,47
Foxi	60,93	719,25	749,86	585,34

Hansi am 6. Tag
starke Verzehrs-
depression

6. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	64,95	362,61	607,47	500,93
Hansi	57,94	132,71	357,01	385,04
Foxi	-	-	-	-

10. Tag

Ver- suchs- tier	Serumgallensäurekonzentration in nmol/ml, Std. nach Fütterung			
	Fütter.	1	2	4
Hubert	40,31	286,87	324,37	121,87
Hansi	59,99	638,90	830,19	288,75
Foxi	-	-	-	-

13. Tag

Tabelle 5: Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren
in nmol/ml nach Gabe von 1000 mg LC/kg KG/Tag
per os, 1, 2 und 4 Stunden nach Fütterung.

4.2.6.2. Postprandialer Anstieg der Serumgallensäuren

Die postprandialen Werte wurden am 3., 6., 10. und 13. Tag bzw. bei dem Hund Foxi wegen steigender Freßunlust nur bis zum 6. Tag bestimmt. Da schon die Nüchternwerte erhöht waren, waren die Konzentrationen nach Nahrungsaufnahme erwartungsgemäß deutlich erhöht (Tabelle 5).

Zu beachten ist, daß die Nüchternwerte nicht mit den postprandialen Werten korrelieren.

4.3. Versuchsreihe VII: Beeinflussung der Lithocholsäurecholestase durch Clanobutin

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Lithocholsäure bei 1000 mg LC/kg KG/Tag, per os über mehrere Tage appliziert, eine dosisabhängige Cholestase erzeugt, sollte in einem orientierenden Versuch geprüft werden, ob das Choleretikum Clanobutin, eine substituierte Anilinocarbonsäure (Byk Gulden), die experimentelle Lithocholatcholestase beeinflußt. Die Substanz ist von besonderem Interesse, da in früheren Versuchen, unter anderem an der isoliert perfundierten Rattenleber, gezeigt werden konnte, daß Clanobutin die Lithocholsäure bedingte Cholestase und die Hemmung des transzellulären Gallensäuretransportes vollständig aufzuheben vermag (35,72).

Drei Beagelhunde erhielten 5 Tage lang 1000 mg LC/kg KG/Tag und ab dem 6. Tag zusätzlich 2 x täglich 10 mg Clanobutin/kg KG/Tag per os.

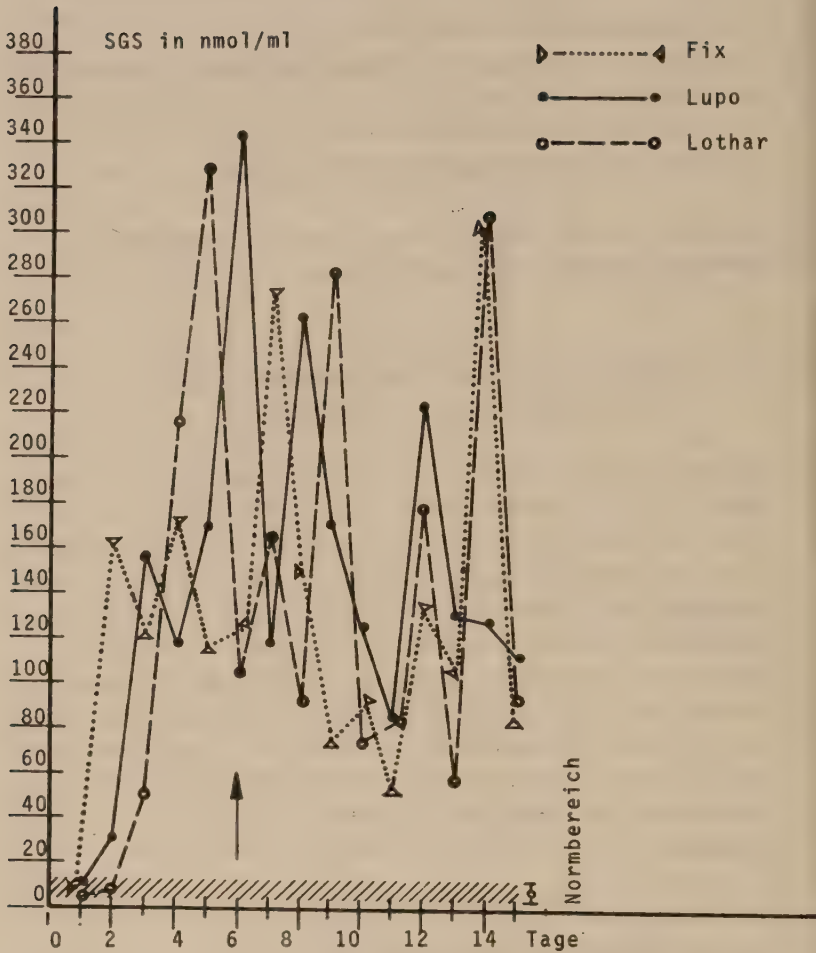


Abb. 8: Serumgallensäuren in nmol/ml nach Gabe von 1000 mg LC/kg KG/Tag + zusätzlich ab dem 6. Behandlungstag 2 x täglich 10 mg Clonobutin/kg KG/Tag per os

↑ = Beginn der Clonobutinbehandlung

Der Versuch wurde 15 Tage beobachtet, dann mußte er wegen Verweigerung der Nahrungsaufnahme abgebrochen werden. Postprandialwerte konnten wegen der anhaltenden, früh einsetzenden Freßunlust nicht gemessen werden.

Das klinische Bild während dieses Versuches entsprach dem ohne Clanobutin. Die Tiere zeigten eine starke Bilirubinämie, mit erwähnter Inappetenz und einem Gewichtsverlust von ca. 20 % des Ausgangsgewichtes. Die Tiere waren munter und temperamentvoll.

Trotz 10-tägiger Applikation von Clanobutin war unter den gewählten Versuchsbedingungen keine eindeutige Senkung der pathologisch erhöhten Serumgallensäuren nachweisbar (Abb. 8).

4.4. Leberbiopsie

Am Ende der Versuchsreihen VI und VII wurde bei allen sechs Hunden eine Leberbiopsie vorgenommen und elektronenoptisch untersucht (siehe Kapitel 3.2.4.). Die Untersuchungen erfolgten in einem Zeiss EM 10 und ergaben folgende ultrastrukturelle Veränderungen:

4.4.1. Versuchsreihe VI: 1000 mg LC/kg KG/Tag

F o x i

- Die Leberzellen und Kupfer'schen Sternzellen zeigen stark elektronendichtes phagozytiertes Material. Sie enthalten einige Fettvakuolen und im allgemeinen wenig Glykogen. In einigen Leberzellen wurde vermehrt Glykogen gefunden.
- Die Zellkerne sind o.b.B.
- Peroxisomen: sind wenig vorhanden
- Endoplasmatisches Retikulum: Das RER ist granuliert und zeigt sich ebenso wie das SER partiell dilatiert. Von RER umgebene Vakuolen sind zu sehen, die teilweise elektronenoptisch leer und teilweise mit elektronendichtem Material gefüllt sind.
- Mitochondrien: Die Cristae mitochondriales sind gebläht, die Matrix ist deutlich elektronendicht.
- Gallekapillaren: Die Mikrovilli sind o.b.B. Im Lumen ist z.T. unregelmäßig geformtes elektronendichtes Material enthalten, einige cholesterinnegativähnliche Gebilde sind festzustellen.

4.4.2. Versuchsreihe VII: 1000 mg LC/kg KG/Tag +
2 x täglich 10 mg Clanobutin/kg KG/Tag

F i x

- Die Zellen weisen viele Phagosomen mit unterschiedlich elektronendichtem Inhalt und viele Siderophagen auf. Sie enthalten wenig Glykogen. Es ist eine Anhäufung feinfilamentärer kollagenähnlicher Faserbündel festzustellen.
- Peroxisomen: sind reichlich vorhanden.
- Zellkerne: sind weitgehend regelmäßig, Nukleole sind selten.
- Endoplasmatisches Retikulum: Das RER ist stark dilatiert, z.T. mit mäßig elektronendichtem Material gefüllt. Es ist homogen und netzartig.
- Mitochondrien: zeigen sich aufgebläht, die Cristae sind geschwollen, die Matrix ist z.T. mäßig, z.T. stark elektronendicht. Es sind deutliche Hohlräume in der Mitochondrienmatrix zu erkennen.
- Gallekapillaren: Die Mikrovilli sind stark geschwunden. Die Gallekapillaren enthalten wolkgiges Material.

L o t h a r (Abb. 9)

- Es sind einige stark elektronendichte, teils homogene, teils granulierte Phagosomen sichtbar. Die Zellen enthalten wenig Fettvakuolen.
- Peroxisomen: sind reichlich vorhanden, Nukleoleide sind selten.
- Zellkerne: erscheinen rund bis oval, sind aber regelmäßig.
- Endoplasmatisches Retikulum: Das RER ist z. T. stark erweitert.
- Mitochondrien: Überwiegend o.b.B., die Matrix ist stark elektronendicht.
- Gallekapillaren: sind erweitert und mit membranartigem Material gefüllt, z.T. tauchen Strukturen auf, die cholesterinähnlich sind. In einigen Kanalikuli fehlen die Mikrovilli teilweise.

L u p o (Abb. 10)

- Die Kupfer'schen Sternzellen sind voll von elektronendichtem phagozytierten Material. Es sind viele Siderophagen zu sehen. Glykogen ist wenig enthalten, aber faserartige Elemente mit kollagenähnlicher Struktur.
- Peroxisomen: sind wenig, teilweise nicht optimal erhalten. Nukleioide tauchen nicht auf.
- Zellkerne: o.b.B.
- Endoplasmatisches Retikulum: Das RER ist dilatiert und z.T. mit mäßig elektronendichtem Material gefüllt. Es enthält sehr viele mitochondriengroße Vakuolen, die teils mit Fett gefüllt sind und z. T. leer sind.
- Mitochondrien: sind überwiegend groß, die Cristae sind gebläht und die Matrix stark elektronendicht. Einige wenige enthalten eine geringe Zahl nicht veränderter Cristae und haben eine wenig elektronendichte Matrix. Es sind außerdem viele intramitochondriale Körperchen zu sehen.
- Gallekapillaren: sind zum Großteil o.b.B. Einige dagegen zeigen stark verkürzte Mikrovilli, die teilweise ganz fehlen. Das Lumen enthält feinwolkiges Material, in einer Gallekapillare wurde ein Gallenzylinder gefunden.



Abb. 9: Elektronenoptische Aufnahme einer Lebergewebsprobe nach 16-tägiger Gabe von 1000 mg LC/kg KG/Tag und 10-tägiger Gabe von 2 x täglich 10 mg Clanobutin/kg KG/Tag per os.
D = Desmosom
K = Kanalikulus (enthält feinwolkiges Material)
M = Mitochondrium

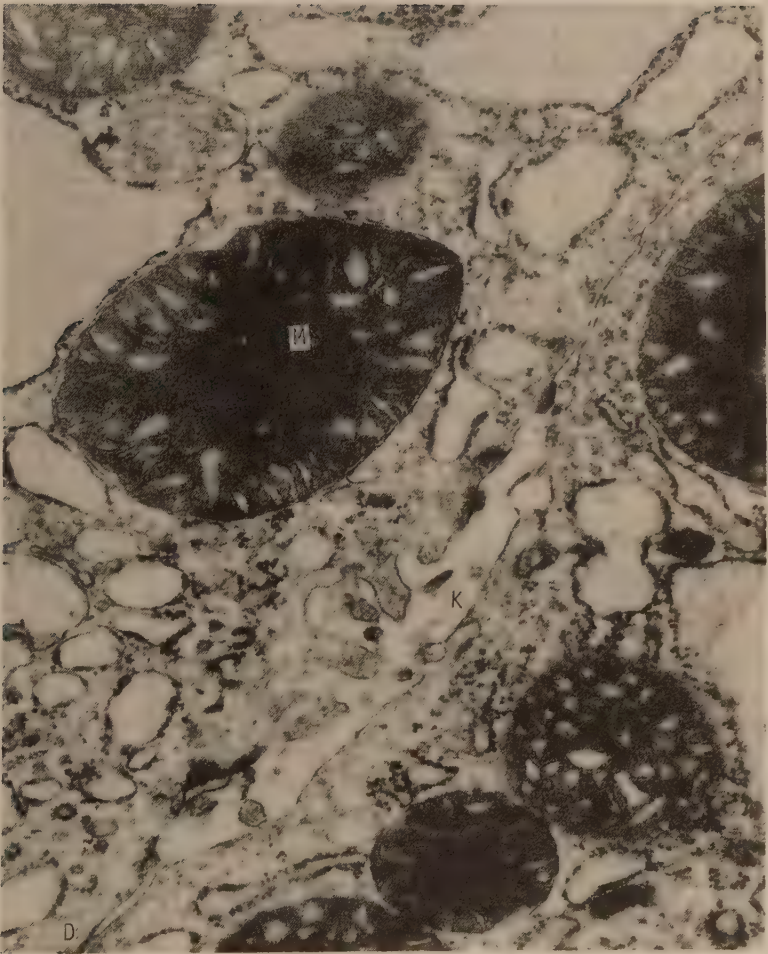


Abb. 10: Elektronenoptische Aufnahme einer Lebergewebsprobe nach 16-tägiger Gabe von 1000 mg LC/kg KG/Tag und 10-tägiger Gabe von 2 x täglich 10 mg Clanobutin/kg KG/Tag per os.
D = Desmosom
K = Kanalikulus
M = Mitochondrium

4.5. Bestimmung des Lipoprotein-X

Aus technischen Gründen konnte die LP-X Bestimmung nur an Hunden der Versuchsreihen I und II durchgeführt werden, bei den weiteren Versuchen mußte darauf verzichtet werden.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, ist bei dem Hund Mike das LP-X schon bei einer Dosis von 40 mg LC/kg KG schwach positiv, während die Serumgallensäuren noch physiologische Konzentrationen aufweisen. Bei Hund Centa dagegen ist auch bei 160 mg LC/kg KG kein LP-X im Serum festzustellen, hier sind auch die Gallensäuren nicht erhöht.

4.6. Bestimmung des Serumgallensäuremusters mittels Dünnschichtchromatographie

4.6.1. R_f-Werte und Auftrennung einzelner standardisierter Gallensäuren

Da beim Hund keine Glycinkonjugate vorkommen, wurden sie hier nicht berücksichtigt (91). Die zweiwertigen Gallensäuren Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure werden bei diesem Verfahren nicht getrennt. Es wurde deshalb nur Chenodesoxycholsäure bzw. dessen Taurinkonjugat verwendet.

Ver- suchs- tier	LP-X	SGS in nmol/ml	Dosis in mg/kg KG	Tag der LC-Gabe
Centa	-	8,05	20	3.
	-	5,48	20	4.
Mike	(+)	8,05	40	3.
	+	5,48	40	4.
Centa	-	1,79	80	3.
	-	3,97	80	5.
	-	6,95	80	6.
Centa	-	2,37	100	2.
	-	5,92	100	4.
	-	3,55	100	5.
	-	3,12	100	6.
Centa	-	8,88	120	1.
	-	9,85	120	2.
	-	2,51	120	4.
	-	6,28	120	5.
	(+)	1,98	120	6.
	+	5,94	120	7.
	(+)	11,49	120	8.
	+	3,57	120	9.

Fortsetzung Seite 80

Tabelle 6: Bestimmung des LP-X bei unterschiedlicher Dosierung von Lithocholsäure.

Ver- suchs- tier	LP-X	SGS in nmol/ml	Dosis in mg/kg KG	Tag der LC-Gabe
Mike	(+)	14,76	160	3.
	-	33,11	160	4.
	-	169,91	160	5.
	(+)	93,66	160	6.
Centa	-	4,00	160	1.
	(+)	5,88	160	2.
	-	1,18	160	3.
	-	2,35	160	4.
	-	6,62	160	6.
Max	+	2,11	160	1.
	+	1,75	160	2.
	+(+)	1,75	160	3.
	+(+)	9,94	160	4.
	+(+)	19,01	160	6.

Fortsetzung Tabelle 6

Die Gallensäurereinsubstanzen trennten sich gut auf (Abb. 11, Tabelle 7). Auch bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie konnten sie eindeutig identifiziert werden (Abb. 12,13).

4.6.2. Taurocholsäure-Verdünnungsreihe

Eine Verdünnungsreihe von Taurocholsäure von 0,05 bis 10 μ mol ergab, daß mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie Gallensäuren unter 1 μ mol nicht mehr nachgewiesen werden können (Abb. 14). Aus diesem Grunde wurden Serumproben von Hunden der Versuchsgruppe III und VII am 12., 14. und 16. bzw. 5., 6., 12. und 14. Behandlungstag vereinigt und gesammelt.

4.6.3. Auftrennung der Gallensäuren aus dem Serum

Es sollte qualitativ geprüft werden, ob der Hund ebenso wie der Mensch in der Lage ist, oral applizierte Lithocholsäure zu sulfatieren und zu entgiften. Deshalb wurde das Fließverhalten von Lithocholsäure-3-Sulfat und Tauroolithocholsäure-3-Sulfat untersucht (Abb. 11,12).

Trotz zweimaliger Extraktion und Vorlauf in Petroläther trennten sich die Gallensäuren aus dem Serum nicht eindeutig, so daß die Interpretation der Ergebnisse schwierig ist.

Aus dem eindimensionalen Verfahren geht hervor, daß Lithocholsäure in großen Mengen nachweisbar ist. Des weiteren sind die unkonjugierten Gallensäuren Cholsäu-

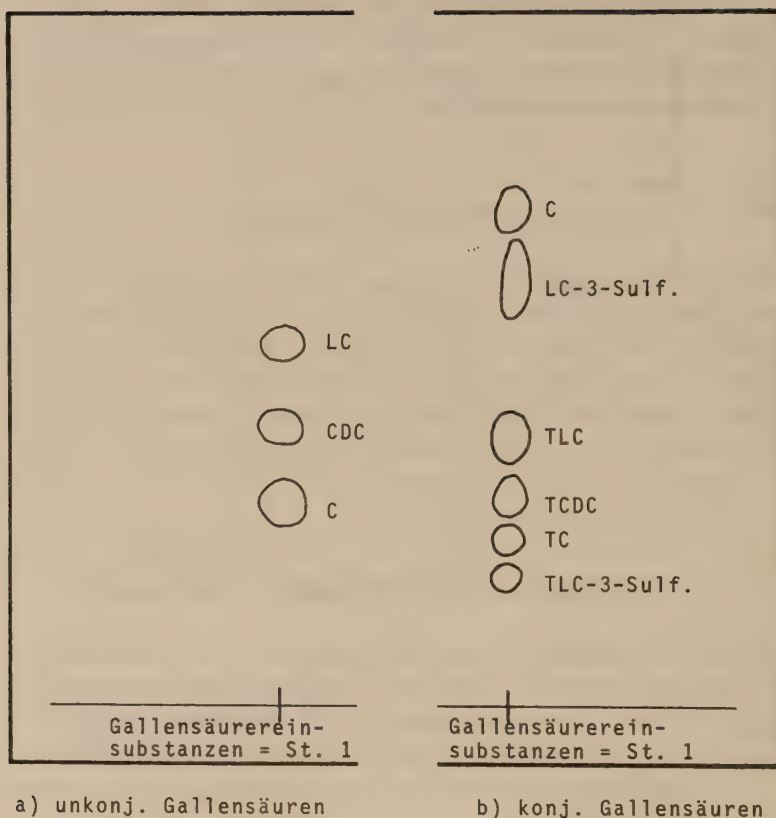


Abb. 11: Auftrennung standartisierter Gallensäurerein-substanzen. a) Fließmittel: Toluol-Essigsäure-Aqua bidest. (50:50:10), b) Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest. (65:24:15:9)
 LC = Lithocholsäure, CDC = Chenodesoxycholsäure, C = Cholsäure, LC-3-Sulf. = Lithocholsäure-3-Sulfat, TLC = Tauroolithocholsäure, TCDC = Taurochenodesoxycholsäure, TC = Taurocholsäure, TLC-3-Sulf. = Tauroolithocholsäure-3-Sulfat

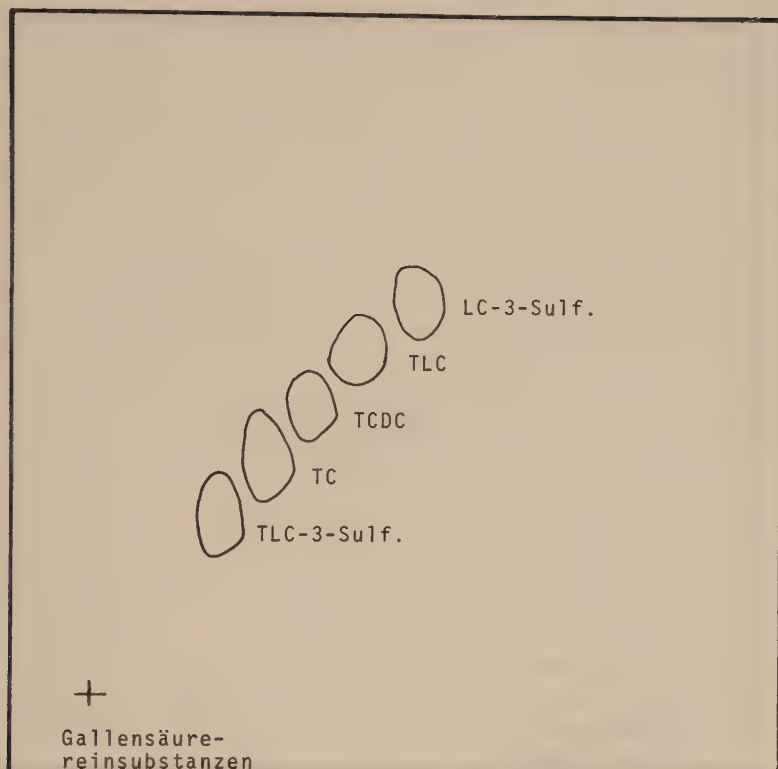


Abb. 12: Auftrennung standartisierter konjugierter Gallensäurereinsubstanzen bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest. (65:24:15:9).

LC-3-Sulf. = Lithocholsäure-3-Sulfat, TLC = Tauroolithocholsäure, TCDC = Taurochenodesoxycholsäure, TC = Taurocholsäure, TLC-3-Sulf. = Tauroolithocholsäure-3-Sulfat.

+ = Auftragungsort



Abb. 13: Auftrennung standartisierter unkonjugierter Gallensäurereinsubstanzen bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.
Fließmittel: Toluol-Essigsäure-Aqua bidest. (50:50:10).
LC = Lithocholsäure, CDC = Chenodesoxycholsäure, C = Cholsäure
+ = Auftragungsort

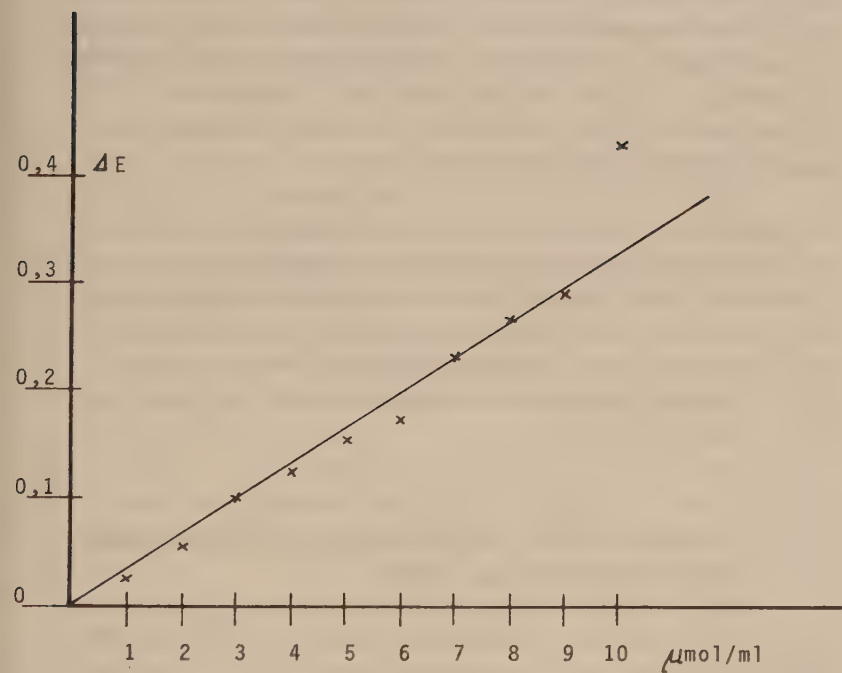


Abb. 14: Taurocholsäurekonzentrationsreihe (1 - 10 μmol) nach Dünnschichtchromatographie, enzymatisch gemessen.

re und bei einer der Proben Chenodesoxycholsäure (oder Desoxycholsäure ?) zu identifizieren (Abb. 15,16, Tabelle 7). Von den konjugierten Gallensäuren sind die Tauroolithocholsäure, Taurochenodesoxycholsäure (oder Taurodesoxycholsäure ?) und die Taurocholsäure nachweisbar. Mit großer Wahrscheinlichkeit kommt auch sulfatierte Lithocholsäure vor (Abb. 17,18, Tabelle 7).

Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ergab einen sicheren Anhalt, daß Lithocholsäure und Cholsäure vorkommen (Abb. 19,20). Sulfatierte Lithocholsäure ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nachweisbar, ebenso wie Taurocholsäure und Tauroolithocholsäure. Ob auch sulfatierte Tauroolithocholsäure enthalten ist, ist zweifelhaft (Abb. 21,22).

4.7. Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen des Hundes

Anhand eines umfangreichen Patientengutes wurden Serumgallensäuren mit den Serumenzymen GOT, GPT, aP und GLDH verglichen ^{x)}.

x) Für den Zugang zu diesen Ergebnissen darf ich mich bei Frau Dr. I. Fiebiger der 1. Medizinischen Tierklinik der Universität München herzlich bedanken.

Es stellte sich die Frage, ob auch bei hepatozellulären Erkrankungen des Hundes die Serumgallensäuren der Enzymbestimmung überlegen ist. Es wurden nur die Nüchternwerte der Serumgallensäuren bestimmt.

Bei Erkrankungen, die schon auf Grund des klinischen Bildes als Hepatopathie zu diagnostizieren waren, waren mit zwei Ausnahmen die Serumgallensäuren gleichsinnig mit den Enzymen erhöht. In einem Fall wiesen jedoch die Serumgallensäuren stark pathologische Konzentration auf (137,5 nmol/ml), während nur die GPT eine geringe Abweichung von der Norm zeigte (42 U/l), in einem anderen Fall waren nur die Serumgallensäuren geringgradig auf 16,0 nmol/ml erhöht (Tabelle 8).

Bei einer Reihe von Erkrankungen war ausschließlich auf Grund der erhöhten Serumgallensäuren auf eine Leberfunktionsstörung zu schließen (Tabelle 9,10).

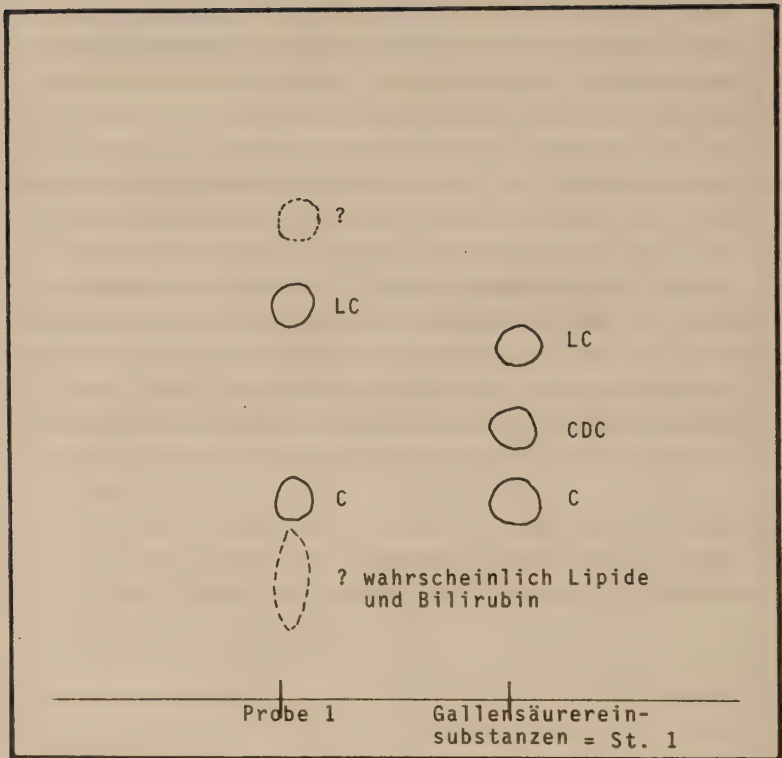


Abb. 15: Auftrennung unkonjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe III am 12., 14. und 16. Behandlungstag.
Fließmittel: Toluol-Essigsäure-Aqua bidest. (50:50:10).
LC = Lithocholsäure, CDC = Chenodesoxycholsäure, C = Cholsäure

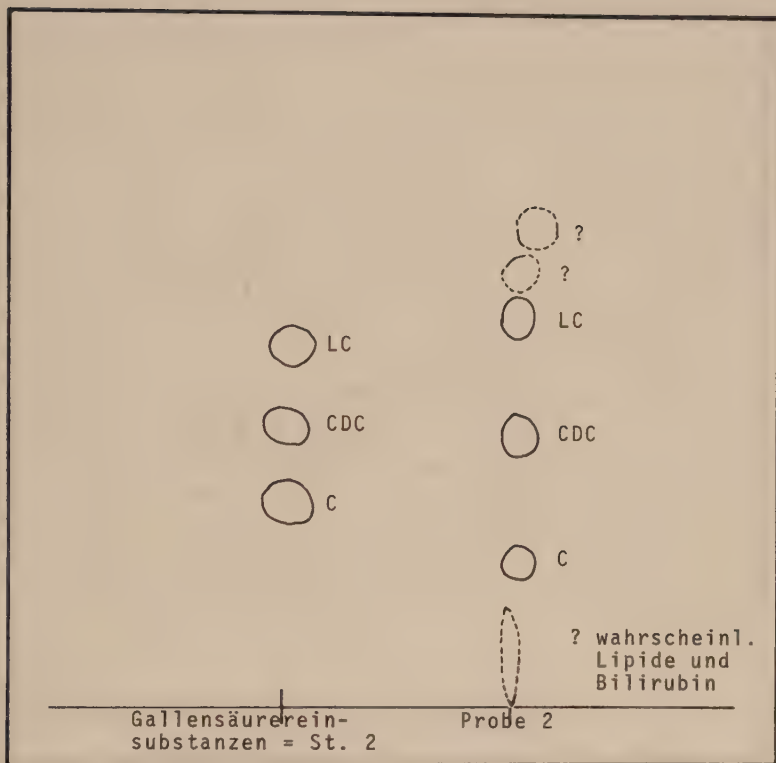


Abb. 16: Auftrennung unkonjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe VII am 5., 6., 12. und 14. Behandlungstag.
 Fließmittel: Toluol-Essigsäure-Aqua bidest. (50:50:10).
 LC = Lithocholsäure, CDC = Chenodesoxycholsäure, C = Cholsäure

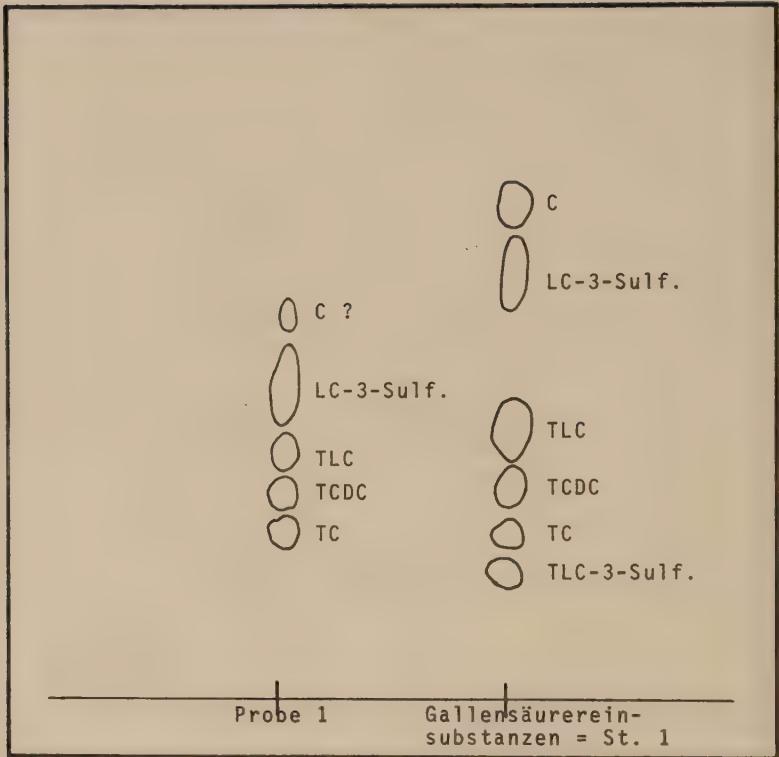


Abb. 17: Auftrennung konjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe III am 12., 14. und 16. Behandlungstag.
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest. (65:24:15:9).
C = Cholsäure, LC-3-Sulf. = Lithocholsäure-3-Sulfat, TLC = Taurolithocholsäure, TCDC = Taurochenodesoxycholsäure, TC = Taurocholsäure, TLC-3-Sulf. = Taurolithocholsäure-3-Sulfat

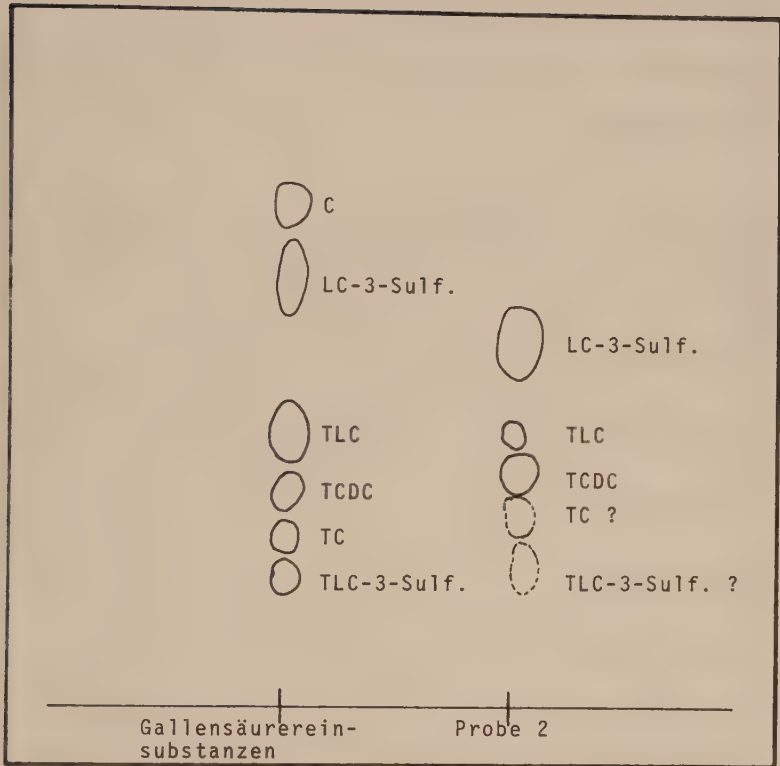


Abb. 18: Auftrennung konjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe VII am 5., 6., 12. und 14. Behandlungstag.
 Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest. (65:24:15:9).
 C = Cholsäure, LC-3-Sulf. = Lithocholsäure-3-Sulfat, TLC = Tauroolithocholsäure, TCDC = Taurochenodesoxycholsäure, TC = Taurocholsäure, TLC-3-Sulf. = Tauroolithocholsäure-3-Sulfat

Gallensäure	R _F -Werte von			
	St. 1	Probe 1	St. 2	Probe 2
Cholsäure	0,8322	0,6516	0,8861	0,6154
Lithochols.-3-Sulf.	0,7097	0,5516	0,5316	0,4679
Taurolithocholsäure	0,4581	0,4193	0,4557	0,4006
Taurochenodesoxychols.	0,3484	0,3484	0,3671	0,3269
Taurocholsäure	0,2742	0,2581	0,2848	0,2372
Taurolithochols.-3-Sulf	0,2322	-	0,1772	-
Lithocholsäure	0,5697	0,6091	0,6087	0,6497
Chenodesoxycholsäure	0,4364	-	0,4503	0,4458
Cholsäure	0,3151	0,3091	0,2609	0,2166

Tabelle 7: R_F-Werte zu Abb. 11, 15, 16, 17, 18.

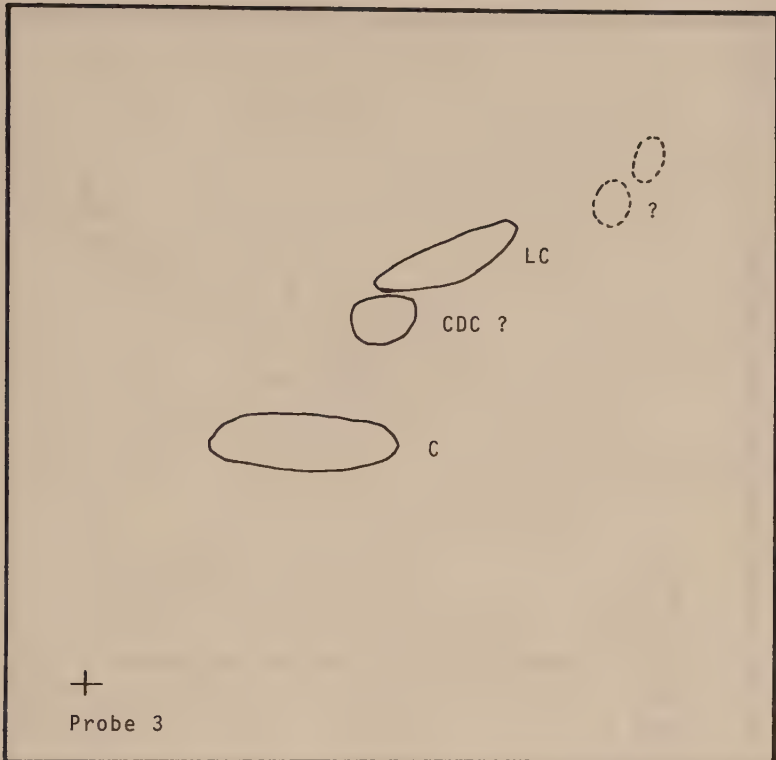


Abb. 19: Auftrennung unkonjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe III am 12., 14. und 16. Behandlungstag bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.

Fließmittel: Toluol-Essigsäure-Aqua bidest. (50:50:10).

LC = Lithocholsäure, CDC = Chenodesoxycholsäure, C = Cholsäure

+ = Auftragungsort

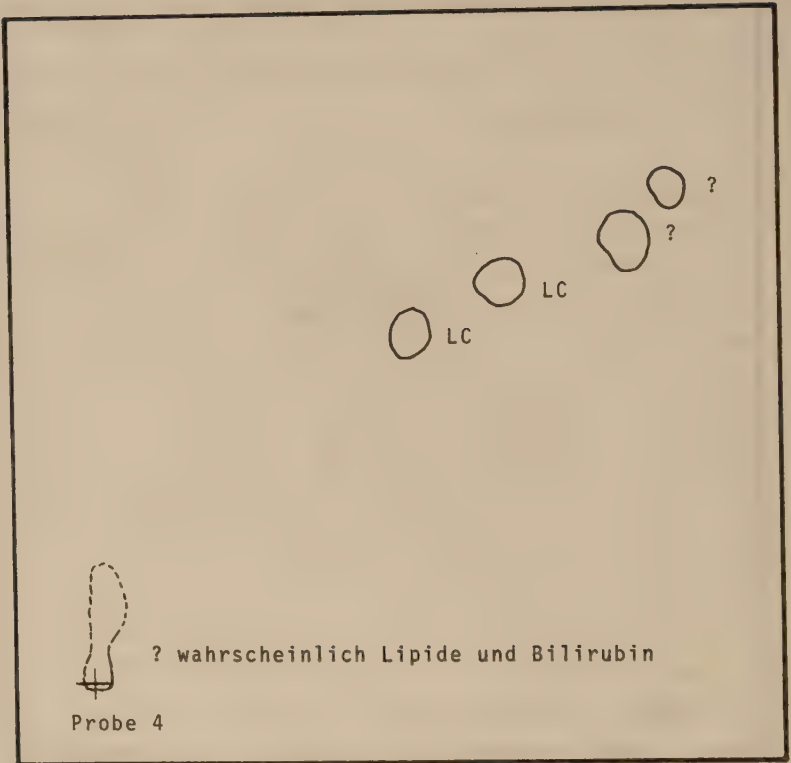


Abb. 20: Auftrennung unkonjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe VII am 5., 6., 12. und 14. Behandlungstag bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.
Fließmittel: Toluol-Essigsäure- Aqua bidest. (50:50:10).
LC = Lithocholsäure
+ = Auftragungsort

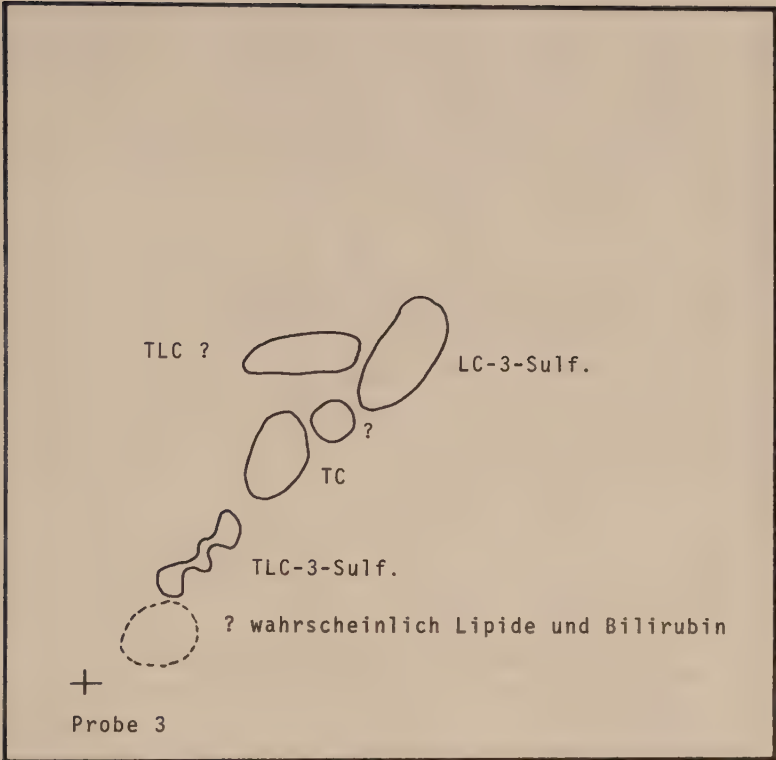


Abb. 21: Auftrennung konjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe III am 12., 14. und 16. Behandlungstag bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest. (65:24:15:9).
LC-3-Sulf. = Lithocholsäure-3-Sulfat, TLC = Tauro-lithocholsäure, TC = Taurocholsäure,
TLC-3-Sulf. = Tauro-lithocholsäure-3-Sulfat.
+ = Auftragungsort

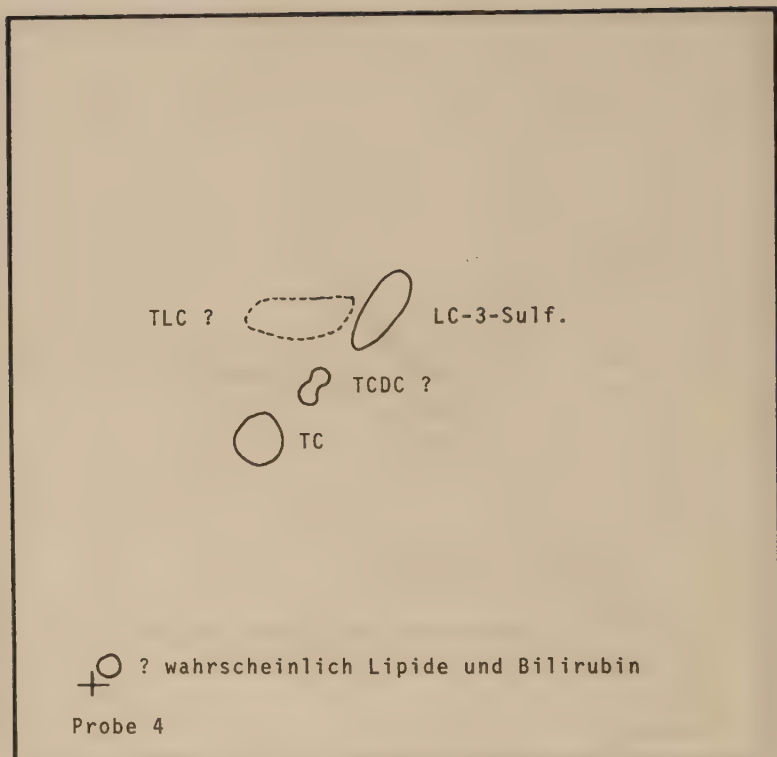


Abb. 22: Auftrennung konjugierter Gallensäuren aus dem Serum von Hunden der Versuchsreihe VII am 5., 6., 12. und 14. Behandlungstag bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie. Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure-Aqua bidest. (65:24:15:9). LC-3-Sulf. = Lithocholsäure-3-Sulfat, TLC = Taurolithocholsäure, TCDC = Taurochenodesoxycholsäure, TC = Taurocholsäure

+ = Auftragungsort

Klinische Diagnose	SGS in nmol/ml	GOT in U/l	GPT in U/l	aP in U/l	GLDH in U/l	
Hepatopathie	190,8	184	286	501	20,4	
	52,5	68	142	420	-	
	23,8	33	157	126	-	
	35,0	25	55	192	-	
	82,5	21	118	435	-	
	137,5	38	42	160	-	(x)
	131,5	102	455	2935	-	
	41,4	14	31	4059	5,2	
	25,8	14	49	204	6,7	
	92,5	300	61	200	-	
	40,3	11	55	759	-	
	122,5	93	690	3740	-	
	85,0	8	55	1122	-	
	137,5	16	737	1089	-	
	23,0	7	30	297	-	
	48,4	15	112	275	-	
	31,8	12	51	217	24,0	
Ikterus	135,4	30	100	3440	16,0	
	72,7	21	34	1628	6,4	
	192,7	31	37	1620	7,4	
Hepatomegalie	30,0	22	74	703	-	
	16,0	34	36	82	-	(x)
Lebertumor	91,4	15	19	2783	1,0	

Tabelle 8: Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen der Leber des Hundes.
x) Serumgallensäuren als einziger Parameter pathologisch verändert.

Klinische Diagnose	SGS in nmol/ml	GOT in U/l	GPT in U/l	aP in U/l	GLDH in U/l	
Gastroenteritis	30,9	8	10	248	-	
	45,0	12	12	66	-	x
	37,5	38	10	122	-	x
	22,4	12	21	148	11,2	
	25,2	12	17	96	-	x
	24,3	12	15	16	1,4	x
Enteritis	34,5	12	45	22	2,4	x
	61,7	12	12	104	2,4	x
	26,7	-	15	192	2,5	(x)
Vomitus	112,5	12	24	201	-	(x)
	33,8	97	-	74	-	
	28,9	19	14	83	-	x
	11,0	88	400	1020	11,6	
Inappetenz	21,3	10	16	162	-	x
	150,4	39	59	340	-	
	24,4	14	9	59	-	x
	22,9	35	38	88	-	x
Magentumor Abmagerung Anorexie	34,1	10	35	62	3,5	x
	38,5	14	21	181	2,1	x
	160,9	44	153	4270	17,6	
	28,2	21	21	115	3,1	x
Diabetes mellitus	84,8	26	31	102	-	x
	29,9	14	125	512	14,8	
	78,5	10	26	1235	7,4	

Tabelle 9: Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes des Hundes.

x) Serumgallensäuren als einziger Parameter pathologisch verändert.

Klinische Diagnose	SGS in nmol/ml	GOT in U/l	GPT in U/l	aP in U/l	GLDH in U/l	
Leukose	38,8	15	72	49	-	
	16,6	14	21	44	-	x
	42,8	28	32	107	-	x
	82,5	38	363	1370	-	
	50,0	22	227	137	-	
	21,0	12	22	107	-	x
Filariose	32,5	8	19	165	-	x
Staupe	28,8	5	8	445	-	
Histoplasmose	24,0	8	18	551	-	
Nocardiose	21,8	15	24	446	34,5	
Dermatitis	23,9	-	15	38	-	x
	21,3	32	21	95	-	x
Kard. Aszites	55,2	16	58	200	-	
	20,0	7	10	52	-	x
Herzinsuffizienz, Lungenödem	37,2	21	250	344	25,0	
Anämie	42,2	-	22	46	3,1	x
	37,5	8	24	980	-	
	23,8	28	38	168	-	x
Thrombocytopenie	50,0	10	24	245	7,7	
Blutamoniak	34,4	10	63	135	17,2	

Fortsetzung Seite 100

Tabelle 10: Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen des Hundes.

x) Serumgallensäuren als einziger Parameter pathologisch verändert.

Klinische Diagnose	SGS in nmol/ml	GOT in U/l	GPT in U/l	aP in U/l	GLDH in U/l	
Polydipsie	19,3	15	33	328	4,2	
	35,0	15	108	159	-	
	45,0	38	35	159	-	x
Urämie	85,0	28	308	1103	-	
Struma	121,6	58	118	1430	55,0	
Alkoholintox.	100,6	74	169	2420	25,0	
Fieberschübe,	22,8	26	22	325	4,9	
Muskelatrophie,						
Tumor						
Epileptoide Anfälle	32,0	-	21	57	2,4	x
Apathie	34,0	12	50	79	3,8	x
	18,8	15	15	41	-	x
Morb. Cushing	70,8	70	700	1980	40,9	
	173,2	50	720	1900	2,8	

Fortsetzung Tabelle 10

5. Diskussion

5.1. Entwicklung eines experimentellen intrahepatischen Cholestasemodells, orale Dosis von Lithocholsäure

Die orale Dosis von 1000 mg LC/kg KG/Tag erzeugt beim Hund innerhalb von 2 Tagen eine Hepatopathie, welche die Bedingungen eines experimentellen Cholestasemodells erfüllt. Es konnte eine Abhängigkeit von der Lithocholatdosis nachgewiesen werden. Mit steigender oraler Dosierung der Lithocholsäure stiegen die Serumgallensäuren von durchschnittlich 8 nmol/ml auf maximal 358,87 nmol/ml an. Nach Gabe von 240 mg LC/kg KG/Tag war keine pathologische Erhöhung festzustellen (Abb. 5). Bei 400 mg LC/kg KG/Tag lagen die Werte bereits das 10-fache, bei 1000 mg LC/kg KG/Tag das 45-fache über der Norm (Abb. 6, 7). Daraus ist zu schließen, daß die Höhe des Serumgallensäurespiegels auch Aufschluß über das Ausmaß des Leberschadens geben kann. Auch die postprandialen Werte der Serumgallensäuren zeigten diese Dosisabhängigkeit (Tabelle 3,4,5).

Aus den elektronenoptischen Untersuchungen der Lebergewebsproben ergaben sich die charakteristischen ultrastrukturellen Veränderungen einer intrahepatischen Cholestase, die schon wiederholt beschrieben wurden (85, 100,111,126). Sie sichern die Diagnose "intrahepatische Cholestase". Besonders die Veränderungen der Kanalikuli und Mikrovilli zeigen, daß Lithocholsäure auch beim Hund an der kanalikulären Membran, d. h. am Gallesekreationsapparat der Hepatozyten angreift. Ähnliche Ergebnisse werden auch bei Ratte und Hamster beschrieben (70,84,

142). Somit entspricht dieses Modell der Pathogenese der intrahepatischen Cholestase, die primär von Sekretionsstörungen an der kanalikulären Membran ausgeht (85,97).

Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche I - III, (160 mg LC/kg KG/Tag), so kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Bastarde der Versuchsreihen I und II durch frühere Versuche bereits einen latenten Leberschaden hatten und deshalb auf die Noxe (Lithocholsäure) sehr empfindlich reagierten. Die folgenden Versuche mit steigender Dosierung zeigten, daß bei gesunden Hunden die Leber gegen Lithocholsäure resistenter ist.

Seit langem ist bekannt, daß mit zunehmendem Alter Leberfunktionen eingeschränkt werden. Die Proteinsynthese und die Enzymaktivitäten sinken (79). Auch die Gallensäuresekretion nimmt mit steigendem Alter ab (73). Dies könnte den pathologischen Anstieg der Serumgallensäuren bei dem Hund Schorschi der Versuchsreihe III erklären (Abb. 4). Andererseits war bei einjährigen Beagelhunden eine relativ hohe Dosis (400 - 1000 mg LC/kg KG/Tag) zur Ausbildung einer experimentellen Cholestase erforderlich.

Obwohl die Proben täglich zur selben Zeit und unter vergleichbaren Bedingungen entnommen wurden, ergaben sich erhebliche Tagesschwankungen der Nüchternwerte von Serumgallensäuren. Durch Lithocholsäure könnte die Metabolisierung im Sinne einer Entgiftung induziert worden sein. Durch erhöhte Ausscheidung der Metabolite kann dann der

Gesamtserumgallensäurespiegel sinken und individuelle Schwankungen der Serumspiegel erklärt werden. Als Entgiftungsmechanismen müssen diskutiert werden:

1. Sulfatierung der Lithocholsäure und Gallensäuren in der 3 α -Position, wie das auch beim Menschen nachgewiesen wurde (47,93). Damit ist die 3 α -Hydroxylgruppe der Gallensäuren blockiert, und die enzymatische Abspaltung des Wasserstoffatoms dieser OH-Gruppe, die der Gallensäurebestimmung vorausgeht, kann nicht erfolgen. Sulfatierte Gallensäuren können mit der angewandten Methode nicht nachgewiesen werden.
2. Hydroxylierung der Lithocholsäure, so daß, ähnlich wie beim Hamster (70), Cholsäure oder/und Chenodesoxycholsäure entsteht, die beide choleretisch wirksam sind.
3. Hepatozelluläre Synthese eines Lithocholsäure bindenden Proteins, das als Ligandin (45) bezeichnet wird. Dadurch kann Lithocholsäure, ohne toxische Wirkung zu entfalten, intrazellulär angereichert werden und entzieht sich der Analyse bei der Bestimmung von Gesamtserumgallensäuren. Da bei Cholestase auch die Lipoproteinsynthese erhöht ist (116), kann die Synthese dieses Proteins durchaus als Schutzmechanismus in Frage kommen.

Zur Klärung dieser möglichen Entgiftungsmechanismen sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Das Absinken der Serumgallensäuren bei Versuch IV (400 mg LC/kg KG/Tag), nach einem initialen Anstieg am 4./5. Behandlungstag, beruht möglicherweise auf der Induktion eines solchen Schutzmechanismus, der die hepatotoxische Lithocholsäure inaktiviert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die cholestatisch wirksame orale Dosis von Lithocholsäure beim Hund zwischen 400 - 1000 mg LC/kg KG/Tag liegt und eine Altersabhängigkeit zeigt. Junge Hunde sind resistenter gegen diese Noxe und benötigen eine höhere Dosis. 1000 mg LC/kg KG/Tag ergeben eine gesicherte Cholestase bei allen Altersgruppen.

5.2. Serumgallensäuren und deren postprandialer Anstieg als Diagnostikum bei der Cholestase des Hundes

Beim Menschen beurteilt man die Bestimmung der Serumgallensäuren schon lange als ein sicheres Zeichen für einen Leberschaden. Vielfach zeigten sich die Serumgallensäuren dabei empfindlicher und zuverlässiger als die Bestimmung der Serumenzyme (37,89,92,115,125). Die Werte der Serumgallensäuren zeigen bei dem vorliegenden Cholestasemodell, daß sie auch beim Hund geeignet sind, gestörte Leberfunktionen anzuzeigen.

Besonders der postprandiale Anstieg von Serumgallensäuren gibt schon früh Aufschluß über eine noch geringe hepatozelluläre Dysfunktion. In Versuch III mit 160 mg LC/kg KG/Tag weichen die postprandialen Werte bereits nach dem 2. Behandlungstag von der Norm ab (Tabelle 2). Mit

Ausnahme des Hundes Schorschi waren die Nüchternwerte im Normbereich, während die postprandialen Werte deutlich auf pathologische Veränderungen hinweisen. Bei dem Hund Wilfried war dies besonders deutlich. Der Nüchternwert stieg von 7,96 nmol/ml gegenüber dem 2-Stundenwert am 18. Tag der Lithocholsäuregabe auf 141,64 nmol/ml an (Tabelle 2).

Von Bedeutung erscheint, daß die Nüchternwerte im Normbereich liegen können, während die Postprandialwerte erhebliche Unterschiede aufweisen. Betrachtet man bei der Dosis von 400 mg LC/kg KG/Tag den Hund Fix am 3. Behandlungstag, so beträgt der 2-Stundenwert 52,96 nmol/ml, der Nüchternwert ist physiologisch (Tabelle 4). Dagegen weist der Hund Hubert bei der Dosis von 1000 mg LC/kg KG/Tag bei einem ebenfalls normalen Nüchternwert am 3. Behandlungstag einen 2-Stundenwert von 568,00 nmol/ml auf (Tabelle 5).

Es zeigt sich beim Hund, genauso wie beim Menschen, daß bei Verdacht auf eine Cholestase und gleichzeitig physiologischen Serumgallensäurewerten der Postprandialwert eine zusätzliche und weit sicherere Information über den vorliegenden Leberstatus geben kann.

5.2.1. Serumgallensäuren und Serumenzyme bei der Lithocholsäurecholestase des Hundes

Bei dem vorliegenden Cholestasemodell reagierten die Serumgallensäuren im Nüchternblut und die Enzyme (aP, GOT, GPT, SDH, GLDH, γ -GT) etwa gleichsinnig, die postprandialen Werte der Gallensäuren zeigten hier jedoch den gesetzten Leberschaden früher an als die Enzyme.

Bei Versuch III (160 mg LC/kg KG/Tag) weichen die Postprandialwerte schon ab dem 4. Behandlungstag von der Norm ab (Tabelle 2), während die Enzyme (aP, GOT, GPT, SDH, GLDH, γ -GT), ebenso wie die Nüchternwerte der Serumgallensäuren erst ab 10. Tag pathologische Konzentrationen zeigten (Winzinger, H., Knoll, L., 1981, unveröffentlicht). Die Dosis von 400 mg LC/kg KG/Tag läßt erst ab dem 4./5. Tag die Serumenzyme ansteigen, wogegen die postprandialen Serumgallensäuren schon am 3. Tag stark von der Norm abweichen (Tabelle 4). Auf Grund der sehr hohen Postprandialwerte ist anzunehmen, daß diese auch schon am 2. Tag erhöht waren. Gleiches gilt für die Dosis von 1000 mg LC/kg KG/Tag.

Die postprandiale Bestimmung der Serumgallensäuren ist somit eindeutig der Enzymbestimmung im Serum als Diagnostikum für die Früherkennung eines Leberschadens überlegen, da bereits geringgradige, morphologisch noch nicht faßbare, Leberfunktionsstörungen angezeigt werden.

5.2.2. Serumgallensäuren und Serumenzyme bei verschiedenen Erkrankungen des Hundes

Bei Hepatopathien, die schon anhand des klinischen Bildes als solche zu erkennen waren, ging die Erhöhung von Serumgallensäuren mit dem Anstieg der Serumenzyme weitgehend parallel. Es handelte sich hier um schwere Leberschäden, die bereits klinisch manifest waren (Tabelle 8).

Bei gastrointestinalen Störungen sprachen die Serumgallensäuren in vielen Fällen für eine Beteiligung der Leber am Krankheitsbild, während die Enzyme diesen Schluß nicht zuließen. Besonders bei unspezifischen Symptomen, wie Erbrechen oder Inappetenz konnte nur auf Grund der teilweise stark erhöhten Gallensäuren im Serum eine Leberfunktionsstörung nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Der Vergleich dieser Parameter spricht dafür, daß neben den Serumgallensäuren die aP eine hohe Leberspezifität aufweist, während die GOT nicht zuverlässig ansteigt (Tabelle 8,9,10) (31).

Die Gegenüberstellung der Serumgallensäuren und der üblichen zur Leberfunktionsprüfung meßbaren Serumenzyme ergibt, daß auch beim Hund in einigen Fällen die Serumgallensäuren einen empfindlicheren Indikator für einen Leberschaden darstellen als die Enzyme, da sie auch bei geringgradigen Erkrankungen der Leber, bei denen die Enzyme noch nicht pathologisch erhöht sind, Leberfunktionsstörungen zuverlässig anzeigen. Für eine endgültige Klärung der Korrelation zwischen Serumenzymen und dem Nachweis von Serumgallensäuren als Diagnostikum sind jedoch

weitere Untersuchungen und Erfahrungen, unter anderem auch die morphologische Kontrolle, erforderlich.

5.3. Serumgallensäuremuster bei der Lithocholsäure-cholestase des Hundes

Das Serumgallensäuremuster ergab bei der Lithocholsäure-cholestase des Hundes einen sicheren qualitativen Nachweis von Tauroolithocholsäure, Taurocholsäure, taurinkonjugierter Dihydroxygallensäure, Lithocholsäure-3-Sulfat, Cholsäure und unkonjugierter Dihydroxygallensäure (Abb. 15 - 22).

Da beim Hund physiologischerweise zum größten Teil nur konjugierte Gallensäuren (Taurinkonjugate) vorkommen (91), läßt die Anwesenheit unkonjugierter Gallensäuren entweder auf eine Verminderung der Taurinverfügbarkeit infolge ständiger Zufuhr von Lithocholsäure schließen, oder auf eine Störung der enzymatischen Konjugation. Ähnliches wurde beim Hund schon anhand von Cholsäureinfusion gezeigt. Mit steigender Infusionsrate stieg auch der Anteil unkonjugierter Gallensäuren, d. h. die Kapazität der Taurinkonjugation kann erschöpft werden (91).

Die Anwesenheit sulfatierter Lithocholsäure zeigt, daß auch der Hund, ebenso wie der Mensch, Ratte und Hamster (47,70), in der Lage ist, die hepatotoxische Lithocholsäure zu inaktivieren und besser ausscheidungsfähig zu machen. Der Hund besitzt demnach im Gegensatz zum Affen einen sehr effektiven Entgiftungsmechanismus für Litho-

cholsäure. Auch die unerwartet hohe cholestatisch wirksame Dosis von 400 - 1000 mg LC/kg KG/Tag kann damit erklärt werden.

Der Anteil an Lithocholsäure am Gallensäurepool war zu erwarten, da fast der gesamte Gallensäurepool durch orale Zufuhr einer einzigen Gallensäure zu ersetzen ist.

5.4. Beeinflussung der Lithocholsäurecholestase durch Clanobutin

Obwohl Clanobutin an der isoliert perfundierten Rattenleber und bei Ratten in vivo die Lithocholsäurecholestase aufheben konnte (35,72), war unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Clanobutin keine eindeutige Beeinflussung der Lithocholsäurecholestase beim Hund zu erreichen. Weder der pathologische Anstieg der Serumgallensäuren noch der Enzyme konnte mit der gewählten Dosierung von Clanobutin deutlich gesenkt werden (Abb. 8). Eine mögliche Erklärung dafür kann sein:

1. Die gewählte Dosis, 2 x täglich 10 mg Clanobutin/kg KG/Tag war zu niedrig.
2. Die orale Applikation war nicht geeignet, ausreichend hohe Serumspiegel von Clanobutin zu gewährleisten.
3. Clanobutin steigert hauptsächlich den GSUF (48) und erhöht somit den Wassergehalt der Galle. Bei der Ratte steigt der Gesamtgallefluß, die Gallen-

säuresekretion wird aber durch Clanobutin wenig beeinflusst (35). Möglicherweise bewirkt Clanobutin beim Hund zwar auch eine Steigerung des Galleflusses auf osmotischem Weg ohne Beeinflussung der Gallensäuresekretion, die pathologisch erhöhten Serumgallensäuren der Lithocholsäurecholestase können aber dadurch nicht gesenkt werden.

4. Vom Hersteller (Byk Gulden) wird beschrieben, daß Clanobutin vielfach nur dann die Leberschädigung verhindern kann, wenn es zu Beginn der Noxe (Thioacetamid z. B.) in ausreichenden Konzentrationen im Organismus vorhanden ist. Da Clanobutin bei den vorliegenden Versuchen erst am 6. Tag der Lithocholsäuregabe appliziert wurde, könnten die Versuchsbedingungen für eine endgültige Aussage ungeeignet gewesen sein.

Die Abklärung dieser Fragen bedarf weiterer Untersuchungen mit variablen Versuchsbedingungen.

5.5. Bestimmung des Lipoprotein-X

Die Bestimmung des LP-X bei den Versuchsreihen I und II ergab bei einem Hund schon bei 40 mg LC/kg KG einen positiven Befund, während bei Hund Centa bei 160 mg LC/kg KG/Tag kein LP-X im Serum festgestellt werden konnte (Tabelle 6), wohl aber bei Hund Max. Die Serumgallensäuren lagen mit Ausnahme des Hundes Mike im physiologischen Bereich.

Diese LP-X Befunde sind aber hinsichtlich ihrer Korrelation zur Lithocholsäuredosis vorsichtig zu interpretieren, da die Tiere seit Jahren schon im Versuch standen und mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits einen chronisch latenten Leberschaden hatten (siehe auch Kapitel 5.1.). Ungeachtet dessen scheinen auch die Bestimmung von LP-X und größere Versuchsserien aufschlußreiche Informationen über den Grad der cholestatischen Leberschädigung des Hundes zu versprechen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde nach oraler Gabe von Lithocholsäure eine experimentelle intrahepatische Cholestase beim Hund entwickelt. Ziel der Arbeit war, ob die Bestimmung von Serumgallensäuren als Diagnostikum für hepatobiliäre Erkrankungen des Hundes geeignet ist.

1. Eine orale Dosis von 1000 mg LC/kg KG/Tag erzeugt beim Hund eine morphologisch gesicherte intrahepatische Cholestase. Es konnte eine eindeutige Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Dieses Modell entspricht der Pathogenese der intrahepatischen Cholestase.
2. Die Serumgallensäuren und besonders deren postprandialer Anstieg stellen ein zusätzliches empfindliches Diagnostikum für die Lithocholsäurecholestase und hepatobiliäre Erkrankungen des Hundes dar. Nach dem bisherigen Stand der Erkenntnisse ist die Analyse von Serumgallensäuren in einer Reihe von Fällen spezifischer als die Bestimmung der in der Leberdiagnostik üblichen Serumenzyme.
3. Das Choleretikum Clanobutin konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen die Lithocholsäurecholestase des Hundes nicht eindeutig beeinflussen.

4. Das Serumgallensäuremuster bei der Lithocholsäure-cholestase des Hundes wurde qualitativ wie folgt analysiert: Taurolithocholsäure, Taurocholsäure, taurinkonjugierte Dihydroxygallensäure, Lithocholsäure-3-Sulfat, Cholsäure und unkonjugierte Dihydroxygallensäure. Der Hund besitzt durch Sulfatierung der Lithocholsäure einen hepatozellulären Schutzmechanismus gegen diese hepatotoxische Gallensäure.

Summary

In the present study an experimental intrahepatic cholestasis was developed in the dog by oral application of lithocholic acid. The aim of the study was to proof the suitability of serum levels of bile acids for the diagnosis of canine hepatobiliary diseases.

1. In the dog an oral dose of 1000 mg LC/kg body weight/day induces a morphological manifest intrahepatic cholestasis. A clear dose dependency could be demonstrated. This model is in accordance with the pathogenesis of the intrahepatic cholestasis.
2. The serum bile acids and especially their post prandial increase represent an additional sensitive parameter for the diagnosis of lithocholic acid-induced cholestasis as well as of canine hepatobiliary diseases. At present knowledge the analysis of serum bile acids exhibits in many cases a higher specificity as compared to the determination of serum enzymes commonly used in liver diagnosis.
3. Under the conditions chosen, the choleric Clano-butin exerted no significant influence on the lithocholic acid-induced cholestasis of the dog.

4. In the course of lithocholic acid-induced cholestasis in the dog, the following qualitative pattern of serum bile acids could be determined: taurolithocholic acid, taurocholic acid, dihydroxylated bile acid conjugated with taurine, lithocholic acid-3-sulfate, cholic acid, and unconjugated dihydroxy-bile acid. In the dog the sulfatation of lithocholic acid displays a hepatocellular protection from this hepatotoxic bile acid.

7. Literaturverzeichnis

1. Accatino, L., Simon, F.R.
Identification and characterization of a bile acid receptor in isolated liver surface membranes.
J.Clin.Invest. 57: 496-508, 1976
2. Admirand, W.H., Small, D.M.
The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man.
J.Clin. Invest. 47: 1043-1052, 1968
3. Allan, R.N., Thistle, J.L., Hofmann, A.F.
Lithocholate metabolism during chenotherapy for gallstone dissolution. 2. Absorption and sulphation.
Gut 17: 413-419, 1976
4. Anwer, M.S.
Untersuchungen zum Mechanismus der Gallebildung und der pharmakainduzierten Cholerese.
Habilitationsschrift aus dem Fachbereich der Tiermedizinischen Fakultät der Universität München, 1980
5. Anwer, M.S., Engelking, L.R., Gronwall, R., Klentz, R.A.
Plasma bile acid elevation following CCl_4 induced liver damage in dogs, sheeps, calves, and ponies.
Res.Vet.Sci. 20: 127-130, 1976
6. Anwer, M.S., Hegner, D.
Effect of Na^+ on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chemie 359: 181-192, 1978
7. Anwer, M.S., Kroker, R., Hegner, D.
Effect of albumine on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Is there a common bile acid carrier?
Biochem.Biophys.Res.Comm. 73: 63-71, 1976
8. Anwer, M.S., Kroker, R., Hegner, D., Petter, A.
Cholic acid binding to isolated rat liver plasma membranes.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chemie 358: 543-553, 1977
9. Becker, B.A., Plaa, G.L.
The nature of α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis.
Tox.Appl.Pharmacol. 7: 680-685, 708-718, 1965

10. van Berge-Henegouwen,G.P., Hofmann,A.F.
Pharmacology of chenodeoxycholic acid. 2. Absorption
and metabolism.
Gastroenterology 73: 300-309, 1977
11. Borgstrom,B.
Effect of tauro-cholic acid on the pH/activity
curve of rat pancreatic lipase.
Biochim.Biophys.Acta 13: 149-154, 1954
12. Borgstrom,B.
Quantification of cholesterol absorption in man by
fecal analysis after the feeding of a single iso-
tope-labeled meal.
J.Lipid.Res. 10: 331-337, 1969
13. Borgstrom,B., Dahlqvist,A., Lundh,G., Sjövall, J.
Studies on intestinal digestion and absorption in
the human.
J.Clin.Invest. 36: 1521-1536, 1957
14. Brauer,R.W., Leong,S.F., Holloway,R.J.
Mechanism of bile secretion. Effect of perfusion
pressure and temperature on bile flow and bile
secretion pressure.
Amer.J.Physiol. 177: 103-112, 1954
15. Bremer,J.
Species differences in the conjugation of free bile
acids with taurine and glycine.
Biochem.J. 63: 507-513, 1956
16. Brooks,S.E.H., Reynolds,P., Andretsch,J.J., Haggio,G.
Scanning electron microscopy of proliferating bile
ductules.
Lab.Invest. 33: 311-315, 1975
17. Burke,C.W., Lewis,B., Panvelivalla,D.
The binding of cholic acid and its taurine conjugate
to serum proteins.
Clin.Chim.Acta 32: 207-214, 1971
18. Campell,C.B., Cowen,A.E., McIvor,W.E.
Bile acid excretion in patients with diarrhoea
following ileal resection.
Aust.N.Z.J.Med. 3: 635, 1973
19. Carey,M.C., Small,D.M.
The characteristics of mixed micellar solution with
particular reference to bile.
Amer.J.Med. 49: 590-608, 1970

20. Carey, M.C., Wilson, I.D., Zaki, F.G., Hanson, R.F.
The metabolism of bile acids with special reference
to liver injury.
Medicine 45: 461-470, 1966
21. Cass, O.W., Cowen, A.E., Hofmann, A.F., Coffin, S.B.
Thin-layer chromatographic separation of sulfated
and nonsulfated lithocholic acid and their glycine
and taurine conjugates.
J.Lipid.Res. 16: 159-160, 1975
22. Cooper, R.A., Admirand, W.H., Garcia, F.A.
The role of lithocholic acid in the pathogenesis
of spur red cells and hemolytic anemia.
J.Clin.Invest. 18: 18a, 1969
23. Cowen, A.E., Campell, C.B.
Bile salt metabolism. 1. The physiology of bile salts.
Aust.N.Z.J.Med. 7: 579-586, 1977
24. Cowen, A.E., Campell, C.B.
Bile salt metabolism. 2. Bile salt and disease.
Aust.N.Z.J.Med. 7: 587-595, 1977
25. Denk, H., Eckerstorfer, R., Rohr, H.P.
The endoplasmatic reticulum of the rat liver cell
in experimental mechanical cholestasis. Correlated
biochemical and ultrastructural morphometric studies
on structure and enzyme composition.
Exp.Mol.Pathol. 26: 193-203, 1977
26. Dietschy, J.M.
Mechanism for the intestinal absorption of bile acids.
J.Lipid.Res. 9: 297-309, 1968
27. Dietschy, J.M.
Mechanism of bile acid and fatty acid absorption
across the unstirred water layer and brush border
of the intestine.
Helv.Med.Acta 37: 89-93, 1973
28. Dillard, G.M., Bodel, P.
Studies on steroid fever. 2. Pyrogenic and anti-
pyrogenic activity in vitro of some endogenous
steroids in man.
J.Clin.Invest. 49: 2418-2426, 1970
29. Dowling, R.H.
The enterohepatic circulation.
Gastroenterol. 62: 122-140, 1972

30. Dujovne, C.A.
Liver cell culture toxicity and surfactant potency
of erythromycine derivatives.
Tox.Appl.Pharmacol. 32: 11-20, 1975
31. Eikmeier, H.
Diagnostische Untersuchungen über die Leberer-
krankungen des Hundes.
Zentr.Bl.Vet.Med. 7: 22-58, 1959
32. Erlinger, S., Dhumeaux, D.
Mechanism and control of secretion of bile water
and electrolytes.
Gastroenterol. 66: 281-304, 1974
33. Evans, W.H., Kremmer, T., Culvenor, J.B.
Role of membranes in bile formation. Comparison
of the composition of bile and a liver bile-
canalicular plasma-membrane subfraction.
Biochem.J. 154: 589-595, 1976
34. Eyssen, H., Vandeputte, M., Evrard, E.
Effect of various dietary bile acids on nutrient
absorption and on liver size in chicks.
Arch.Int.Pharmacodyn. 158: 292-306, 1965
35. Fiebiger, I.
Versuche zur Entwicklung eines Cholestasemodells
bei der Ratte und dessen Beeinflussung durch
Choleretika.
Dissertationsschrift aus dem Fachbereich der Tier-
medizinischen Fakultät der Universität München, 1980
36. French, S.W.
Is cholestasis due to microfilament failure?
Hum.Pathol. 7: 243-244, 1976
37. Frosch, B., Wagener, H.
Methoden und Ergebnisse der quantitativen Bestimmung
der konjugierten Serumgallensäuren bei Erkrankungen
der Leber.
Klin.Wschr. 46: 913-922, 1968
38. Gadacz, T.R., Allan, R.N., Mack, E., Hofmann, A.F.
Impaired lithocholate sulfation in the rhesus
monkey: A possible mechanism for chenodeoxycholate
toxicity.
Gastroenterol. 70: 1125-1129, 1976

39. Graf, J.
Possible role of a microtubular microfilamentous system in bile formation.
Digestion 12: 306, 1975
40. Grasbeck, R., Nyberg, W., Reizenstein, P.
Biliary and fecal vitamin B₁₂ excretion in man. An isotope study.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97: 780-784, 1958
41. Greim, H., Trülzsch, D., Czygan, P., Rudick, J., Hutterer, F., Schaffner, F., Popper, H.
Mechanism of cholestasis. 5. Bile acids in normal rat livers and those after bile duct ligation.
Gastroenterol. 63: 837-845, 1972a
42. Greim, H., Trülzsch, D., Czygan, P., Rudick, J., Hutterer, F., Schaffner, F., Popper, H.
Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with and without biliary obstruction.
Gastroenterol. 63: 846-850, 1972a
43. Guder, W. G.
Modell Leber-Erkrankung
in: Validität klin.-chem. Befunde, Hrsg. Lang, H., Rick, W., Büttner, H., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1980
44. Hardison, W. G. M., Apter, J. T.
Micellar theory of biliary cholesterol excretion.
Amer. J. Physiol. 222: 61-67, 1972
45. Hayes, J. D., Strange, R. C., Percy-Robb, I. W.
Identification of two lithocholic acid-binding proteins. (Separation of ligandin from glutathione S-transferase B).
Biochem. J. 181: 699-708, 1979
46. Hazlewood, D.
The biological significance of chemical difference of bile salts.
Biol. Rev. 39: 537-574, 1964
47. Heaton, K. W.
Bile salts.
in: Liver and biliary disease, Hrsg. Wright, K. G. M. M., Kavan, S., Millward-Sadler, G. H., W. B. Saunders Company, London, Philadelphia, Toronto, 233-254, 1979

48. Hegner,D., Kroker,R., Anwer,M.S.
Der Einfluß von Clanobutin auf die Gallesekretion
der isoliert perfundierten Rattenleber.
Arzneimittelforschung/Drug Res. 29: 11-15, 1979
49. Hepner,G.W., Hofmann,A.F., Thomas,P.J.
Metabolism of steroid and amino acid moieties of
conjugated bile acids in man. 1. Cholyglycine.
J.Clin.Invest. 51: 1889-1897, 1972
50. Hoenig,V., Preisig,R.
Organic-anionic choleresis in the dog: Comparative
effects of bromsulalein, ioglycamide and taurocholate.
Biomedicine 18: 23-30, 1970
51. Hofmann,A.F., Borgstrom,B.
The intraluminal phase of fat digestion in man:
The lipid content of the micellar and oil phases
of intestinal content obtained during fat digestion
and absorption.
J.Clin.Invest. 43: 247-257, 1964
52. Holsti,P.
Cirrhosis of the liver induced in rabbits by
gastric instillation of 3-monohydroxy-cholanoic
acid.
Nature 186: 250, 1960
53. Holsti,P.
Experimental cirrhosis of the liver in rabbits
induced by gastric instillation of desiccated
whole bile.
Acta Path.Microbiol.Scand. 112: 1-67, 1956
54. Horall,O.H.
Bile: Its toxicity and relation to disease.
Chicago, University of Chicago Press, 1938
55. Hunt,R.D.
Proliferation of bile ductules (the ductular cell
reaction) induced by lithocholic acid.
Fed.Proc. 24: 431-433, 1965
56. Hunt,R.D., Leveille,G.A., Sauberlich,H.E.
Dietary bile acids and lipid metabolism. 2. The
ductular cell reaction induced by lithocholic acid.
Proc.Soc.J.Exp.Biol. 113: 139-142, 1963

57. Hunt, R.D., Leveille, G.A., Sauberlich, H.E.
Dietary bile acids and lipid metabolism. 3. Effects
of lithocholic acid in mammalian species.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 115: 277-280, 1964
58. Hutterer, F., Bacchin, P.G., Raisfeld, I.H.,
Schenkman, J.B., Schaffner, F., Popper, H.
Alteration of microsomal biotransformation in the
liver in cholestasis.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133: 702-706, 1970a
59. Hutterer, F., Klion, F.M., Wengraf, A., Schaffner, F.,
Popper, H.
Hepatocellular adaption and injury. Structural and
biochemical changes following dieldrin and methyl
butter yellow.
Lab.Invest. 20: 455-464, 1969
60. Indacochea-Redmond, N., Plaa, G.L.
Functional effects of α -naphthylisothiocyanate
in various species.
Tox.Appl.Pharmacol. 19: 71-80, 1971
61. Ivy, A.C.
The applied physiology of bile secretion and bile
salt therapy.
JAMA 117: 1151-1154, 1941
62. Jansen, P.L.M., Chodhury, J.R., Fischberg, E.B.,
Arias, I.M.
Enzymatic conversion of bilirubin monoglucuronide
to diglucuronide by rat liver plasma membranes.
J.Biol.Chem. 252: 2710-2716, 1977
63. Javitt, N.B.
Cholestasis in rats induced by tauroolithocholate.
Nature 210: 1262-1263, 1966
64. Javitt, N.B.
Hepatic bile formation.
N.Engl.J.Med. 295: 1464-1469, 1511-1516, 1976a
65. Javitt, N.B., Emeran, S.
Effect of sodium tauroolithocholate on bile flow
and bile acid excretion.
J.Clin.Invest. 47: 1002-1014, 1968
66. Jörgenson, M.
A sterological study of intrahepatic bile duct.
2. Bile duct proliferation in some pathologic
conditions.
Acta Path.Microbiol.Scand., Section A 81: 663-669, 1973

67. Kaplowitz, N., Kok, E., Javitt, N.B.
Postprandial serum bile acid for the detection
of hepatobiliary disease.
J. Amer. Med. Association 225: 292-293, 1973
68. Keller, P.
Enzymaktivität bei kleinen Haustieren und Labor-
tieren organanalytisch, Plasmaspiegel und intra-
zelluläre Verteilung.
Kleintierpraxis 24: 51-68, 1979
69. Kendler, J., Anuras, S., Laborda, D., Zimmermann, H.J.
Perfusion of the isolated perfused rat liver with
erythromycin estolate and other derivatives.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139: 1272-1275, 1972
70. King, J.E., Schoenfield, L.J.
Cholestasis induced by sodium tauro lithocholate
in isolated hamster liver.
J. Clin. Invest. 50: 2305-2312, 1971
71. Kirby, J., Heaton, K.W., Burton, J.L.
Pruritic effect of bile salts.
Brit. Med. J. iv: 693-695, 1974
72. Kroker, R.
Die Entwicklung eines Kompartimentmodells zur
Untersuchung des Gallensäuretransportes und dessen
Beeinflussung durch Pharmaka in der isoliert per-
fundierten Rattenleber.
Habilitationsschrift aus dem Fachbereich der Tier-
medizinischen Fakultät der Universität München, 1978
73. Kroker, R.
Liver and aging.
4th International Giessener Symposium on Experi-
mental Gerontology, Sonderdruck, Hrsg. Platt, D.,
Verlag Schattauer, F.K., 127-134, 1977
74. Layden, T.J., Schwarz, J., Boyer, J.L.
Scanning electron microscopy of the rat liver:
Studies of the effect of tauro lithocholate and
other models of cholestasis.
Gastroenterol. 69: 724-738, 1975
75. Lester, R., Schmid, R.
Intestinal absorption of bile pigments. 2. Bilirubin
absorption in man.
N. Engl. J. Med. 269: 4-10, 1963

76. Leveille, G.A., Hunt, R.D., Sauberlich, H.E.
Dietary bile acids and lipid metabolism. 4. Dietary level of lithocholic acid for chicks.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115: 569-572, 1964
77. Lindblad, L., Lundholm, K., Schersten, T.
Bile acid concentrations in systemic and portal serum in presumably normal man and in cholestatic and cirrhotic conditions.
Scand. Gastroenterol. 12: 395-400, 1977
78. Low-Beer, T.S., Tyor, M.P., Lack, L.
Effects of sulfation of tauroolithocholate and glycolithocholic acids on their intestinal transport.
Gastroenterol. 56: 721-726, 1969
79. Mainwaring, W.J.
The effects of age on protein synthesis in mouse liver.
Biochem. J. 113: 869-873, 1969
80. Makino, I., Hashimoto, H., Shinozaki, K., Yoshino, K., Nakayama, S.
Sulfated and nonsulfated bile acids in urine, serum, and bile of patients with hepatobiliary disease.
Gastroenterol. 68: 545-553, 1975a
81. Mashige, Y., Imai, K., Osuga, T.
A simple and sensitive assay of total serum bile acids.
Clin. Chim. Acta 70: 79-86, 1976
82. Mayr, K.
Lipoprotein-X und andere klinisch-chemische Parameter bei Cholestase.
Wiener Med. Wschr. 126: 378-380, 1976
83. Mendelsohn, D., Mendelsohn, L., Staple, E.
The catabolism in vitro of cholesterol: Formation of the 7-epimeric hydroxy-cholesterols from cholesterol in rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 97: 379-381, 1965
84. Miyai, K., Mayr, W., Richardson, A.L.
Acute cholestasis induced by lithocholic acid in the rat.
Lab. Invest. 32: 527-535, 1975

85. Miyai,K., Price,V.M., Fisher,M.M.
Bile acid metabolism in mammals. Ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chenodeoxycholic acid in the rat. Lab.Invest. 24: 292-302, 1971
86. Miyai,K., Richardson,A.L., Mayr,W., Javitt,N.B.
Subcellular pathology in rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3 β -hydroxy-5 cholenoic, cholic and dehydrocholic acids. Lab.Invest. 36: 249-258, 1977
87. Montesano,R., Friend,D.S., Perret,A., Orci,L.
In vivo assembly of tight junctions in fetal rat liver. J.Cell Biol. 67: 310-319, 1975
88. Morris,J.S., Heaton,K.W.
The fate of labeled bile salts introduced into the colon. Scand.J.Gastroenterol. 9: 33-39, 1974
89. Neale,G., Lewis,B., Weaver,V., Panveliwalla,D.
Serum bile acids in liver disease. Gut 12: 145-152, 1971
90. O'Maille,E.R.L., Richardson,T.G., Short,A.H.
Factors determining the maximal rate of organic anion secretion by the liver and further evidence on the hepatic site of action of the hormone secretin. J.Physiol. 186: 424-426, 1966
91. O'Maille,E.R.L., Richardson,T.G., Short,A.H.
The influence of conjugation of cholic acid on its uptake and secretion: Hepatic Atraction of taurocholate and cholate in the dog. J.Physiol. 189: 337-350, 1967
92. Palmer,R.H.
Bile acids, liver injury, and liver disease. Arch.Intern.Med. 130: 606-617, 1972
93. Palmer,R.H.
Formation of bile acids sulfates: A new pathway of bile acid metabolism in human. Proc.Nat.Acad.Sci. 58: 1047-1050, 1967

94. Phillips, M.J., Oda, M., Mak, E., Fisher, M.M.
Jeejeehoy, H.N.
Microfilament dysfunction as a possible cause of
intrahepatic cholestasis.
Gastroenterol. 69: 48-58, 1975
95. Plaa, G.L., Priestly, B.G.
Intrahepatic cholestasis induced by drugs and
chemicals.
Pharmacol. Rev. 28: 207-273, 1977
96. Pomare, E.W., Heaton, K.W.
The effect of cholecystectomy on bile salt metabolism.
Gut 14: 753-762, 1973b
97. Popper, H.
Cholestasis.
Ann. Rev. Med. 19: 39-56, 1968
98. Popper, H.
The mechanism of cholestasis.
in: The liver and bile, Hrsg. Bianchi, L., Gerok, W.,
Sickinger, K., Baltimore, University Park Press,
187-199, 1977
99. Popper, H., Schaffner, F.
Drug-induced hepatic injury.
Ann. Intern. Med. 51: 1230-1251, 1959
100. Popper, H., Schaffner, F.
Pathophysiology of cholestasis.
Human. Pathol. 1: 1-24, 1970
101. Pospischil, A., von Bomhard, D.
Der Einsatz des Elektronenmikroskops in der Diagno-
stik des Veterinärpathologen. 1. Der Einfluß der
Autolyse auf die Ultrastruktur und den Erhaltungs-
zustand der Bauchspeicheldrüse des Hundes.
Zbl. Vet. Med. A 26: 643-651, 1979
102. Preisig, R., Bircher, J.
Die Abklärung des Patienten mit Cholestase.
Therap. Umschau 35: 734-737, 1978
103. Preisig, R., Cooper, H.L., Wheeler, H.O.
The relationship between taurocholate secretion
rate and bile production in the unanesthetized
dog during cholinergic blockade and during secretin
administration.
J. Clin. Invest. 41: 1152-1162, 1962

104. Rudman,D., Kendall,F.Z.
Bile acid content of human serum. 1. Serum bile acids in patients with hepatic disease.
J.Clin.Invest. 36: 530-537, 1957
105. Salen,G., Nicolai,G., Shefer,S., Mosbach,E.H.
Hepatic cholesterol metabolism in patients with gallstones.
Gastroenterol. 69: 676-684, 1975
106. Sallee,V.L., Dietschy,J.M.
The role of bile acid micelles in absorption of fatty acids across the intestinal brush border.
J.Clin.Invest. 40: 80A, 1971
107. Sasaki,H., Schaffner,F., Popper,H.
Bile ductules in cholestasis: Morphologic evidence for secretion and absorption in man.
Lab.Invest. 96: 84-95, 1967
108. Saunders,D.R.
Insignificance of the enterobiliary circulation of lecithin in man.
Gastroenterol. 59: 848-852, 1970
109. Schaffner,F., Javitt,N.B.
Morphologic changes in hamster liver during intra-hepatic cholestasis induced by tauroolithocholate.
Lab.Invest. 15: 1783-1792, 1966
110. Schaffner,F., Popper,H.
Cholestasis is the result of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmatic reticulum in the hepatocyte.
Lancet ii: 355-359, 1969
111. Schaffner,F., Popper,H.
Classification and mechanism of cholestasis.
in: Liver and biliary disease, Hrsg. Wright,K.G.M.M., Warran,S., Millward-Sadler,G.H., W.B.Saunders Company, London, Philadelphia, Toronto, 296-323, 1979
112. Schaffner,F., Popper,H., Perez,V.
Changes in bile canaliculi produced by norethandrolone: Electron microscopic study of human and rat liver.
J.Lab.Clin.Med. 56: 623-628, 1960

113. Schaffner, F., Scharnbeck, H.H., Hutterer, F., Denk, H., Greim, H., Popper, H.
Mechanism of cholestasis. 7. α -naphthylisothiocyanate-induced jaundice.
Lab. Invest. 28: 321-331, 1973
114. Schiff, E.R., Dietschy, J.M.
Comparative kinetics of active transport of bile acid analogues.
J. Clin. Invest. 47: 87A, 1968
115. Schwarz, H.P., Paumgartner, G., Preisig, R.
Diagnostische Bedeutung der Serumgallensäuren.
Schweiz. Med. Wschr. 105: 533-535, 1975
116. Seidel, D., Alanpovic, P., Furman, R.H., McConath, W.J.
A lipoprotein characterizing obstructive jaundice.
2. Isolation and partial characterization of the protein moieties of low density lipoproteins.
J. Clin. Invest. 49: 2396-2407, 1970
117. Sharma, J.N., Prasad, C.R.
Effect of chlor promazine on the bile secretion in dogs.
Indian. J. Med. Res. 55: 258-260, 1967
118. Shefer, S., Hauser, S., Bekersky, I., Mosbach, E.H.
Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat.
J. Lipid Res. 11: 404-411, 1970
119. Simon, F.R., Avias, I.M.
Alteration of bile canalicular enzymes in cholestasis. A possible cause of bile secretory failure.
J. Clin. Invest. 57: 765-775, 1973
120. Small, D.M., Bourges, M., Dervichian, D.G.
Biophysics of lipid association. 3. The quaternary systems lecithin-bile-salt-cholesterol-water.
Biochim. Biophys. Acta 144: 189-201, 1966
121. Small, D.H., Dowling, R.H., Redinger, R.N.
The enterohepatic circulation of bile salts.
Arch. Intern. Med. 130: 552-573, 1972
122. Stakeberg, H., Lundberg, H., Schersten, T.
Rate of in vitro incorporation of precursors into hepatic lipids and proteins in patients with extra-hepatic cholestasis.
Europ. J. Clin. Invest. 4: 399-403, 1974

123. Stasiewics,J., Wormsley,K.G.
Functional control of the biliary tract.
Acta Hepatogastroenterol. 21: 450-468, 1974
124. Stiehl,A.
Disturbances of bile acid metabolism in cholestasis.
Clin.Gastroenterol. 6: 45-68, 1977
125. Stiehl,A., Ast,E., Czygan,P., Fröhling,W.,
Raedsch,R., Kommerell,B.
Die Serumgallensäuren bei Patienten mit hepato-
biliären Erkrankungen. Ein empfindlicher Indikator
eines Leberparenchymschadens oder einer Cholestase.
Inn.Med. 5: 14-21, 1978
126. Stolk,A.
Induction of hepatic cirrhosis in the axoloth by
3-mono-hydroxycholanic treatment.
Naturwiss. 48: 671, 1961
127. Strasberg,I.M., Ilson,R.G., Petrunka,C.N.,
Paloheimo,J.E.
Tauroolithocholic acid and chlorpromazine cholestasis
in the rhesus monkey.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 57: 1138-1147, 1979
128. Suld,H.M., Staple,E., Gurin,S.
Mechanism of formation of bile acids from cholesterol:
Oxidation of 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol
and formation of propionic acid from the side chain
by rat liver mitochondria.
J.Biol.Chem. 237: 338-345, 1962
129. Tamesue,N., Juniper,K.
Concentration of bile salts at the critical micellar
concentration of human gallbladder bile.
Gastroenterol. 52: 473-479, 1967
130. Walldi,D.
Gallensäuren.
in: Dünnschicht-Chromatographie, Hrsg. Stahl,E.,
Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg,
277-280, 1962
131. Webling,D.D.A., Holdsworth,E.S.
Bile and the absorption of strontium and iron.
Biochem.J. 100: 661-665, 1966

132. Webling, D.D.A., Holdsworth, E.S.
Bile salts and calcium absorption.
Biochem.J. 100: 652-655, 1966
133. Weismann, G., Keiser, H.
Hemolysis and augmentation of hemolysis by neutral
steroids and bile acids.
Biochem.Pharmacol. 14: 537-546, 1965
134. Wheeler, H.O.
Secretion of bile acids by the liver and their
role in the formation of hepatic bile.
Arch.Intern.Med. 130: 533-541, 1972
135. Wilson, R.A., Webster, K.H., Hofmann, A.F., Summer-
skill, W.H.
Toward an artificial liver: In vitro removal of
unbound and protein bound plasma compounds related
to hepatic failure.
Gastroenterol. 62: 1191-1198, 1972
136. Witzleben, C.L.
Manganese-induced cholestasis: Concomitant obser-
vations on bile flow rate and hepatic ultrastructure
Amer.J.Pathol. 57: 617-625, 1969
137. Witzleben, C.L., Pitlick, P., Bergmeyer, J., Benoit, R.
Acute manganese overload. A new experimental model
of intrahepatic cholestasis.
Amer.J.Pathol. 53: 409-423, 1968
138. De Wolf-Peeters, C., De Vos, R., Desmet, V.
Histochemical evidence of a cholestatic period
in neonatal rats.
Pediat.Res. 5: 704-709, 1971
139. Wootton, A.M., Neale, G., Moss, D.W.
Enzyme activities of cells of different types
isolated from livers of normal and cholestatic
rats.
Clin.Sci.Mol.Med. 52: 585-590, 1977
140. Yamada, T., Ida, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K.,
Takasan, H., Honjo, I.
Two distinct patterns of glucose intolerance in
icteric rats and rabbits. Relationship to impaired
liver mitochondria functions.
J.Lab.Clin.Med. 86: 38-45, 1975

141. Yousef, I.M., Bloxam, D.L., Phillips, M.J., Fisher, M.M.
Liver cell plasma membrane and the origin of
biliary phospholipids.
Can. J. Biochem. 53: 989-997, 1975
142. Yousef, I.M., Kakis, G., Fisher, M.M.
Lithocholate-induced intrahepatic cholestasis.
Gastroenterol. 70: 996, 1976

Herrn Prof. Dr. D. Hegner danke ich herzlichst für die
Überlassung des Themas, für seine wissenschaftliche An-
leitung und die bereitwillige Unterstützung bei der
Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name: Angelika Freitag, geb. Höhne

geboren: 26.08.1953 in Steinhöring

Eltern: Herbert Höhne, Dipl. Ing.
Doris Höhne, geb. Steiner

Familienstand: seit 13.12.1980 verheiratet mit
dem Architekten Gerhard Freitag

Schul Ausbildung: 1960 bis 1964 Volksschule Simbach/Inn
1964 bis 1973 Tassilo-Gymnasium Simbach
1973 Reifeprüfung am Tassilo-Gymnasium
Simbach

Studium: 1973 bis 1974 Chemie an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
1974 bis 1979 Tiermedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Tierärztliche Prüfung: 13.12.1979

Approbation: 06.03.1980

